



(51) 国際特許分類6 <b>C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00</b>		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO00/20455</b>  (43) 国際公開日 <b>2000年4月13日(13.04.00)</b>
<p>(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP99/05366</b></p> <p>(22) 国際出願日 <b>1999年9月30日(30.09.99)</b></p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/279535 <b>1998年10月1日(01.10.98)</b></p> <p>(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 渡辺卓也(WATANABE, Takuya)[JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-404号 Ibaraki, (JP) 寺尾寧子(TERAO, Yasuko)[JP/JP] 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地-307号 Ibaraki, (JP) 松井英起(MATSUI, Hideki)[JP/JP] 〒305-0044 茨城県つくば市並木4丁目16番地1-708号 Ibaraki, (JP)</p>		JP	<p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHINA, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: <b>NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF</b></p> <p>(54) 発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA</p> <p>(57) Abstract A novel human-derived G protein-coupled receptor protein or a peptide fragment thereof; a nucleic acid encoding this receptor protein and its derivative, etc. The G protein-coupled receptor protein derived from human hippocampus or the nucleic acid encoding the same and its derivative are usable in determining a ligand (agonist) to the above G protein-coupled receptor protein, as preventives and/or remedies for diseases in association with the malfunction of the above G protein-coupled receptor protein, as gene diagnostics, in screening a compound capable of changing the expression dose of the receptor protein or its peptide fragment, etc.</p>			

本発明はヒト由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質をコードする核酸およびその誘導体などに関する。

本発明のヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードする核酸及びその誘導体は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、遺伝子診断剤、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法などに用いることができる。

## PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スードン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルク	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジ蘭
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴー
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	モルダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゲスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	共和国		TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴースラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、ヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAに関する。

## 背景技術

10 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein(以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、  
15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7TMR)と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセ  
20 プターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内に

は未だ未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質にいてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であ

10 った。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、

15 その機能を推定することは困難である。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用してきた。従  
20 って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

25 しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。また、これらオーファンレセプターを用い、そのシグナル伝達を指標として、そ

これらに対応するリガンドを見出す試みにより新規なホルモンや生理活性物質が見出された例 [ S. Hinuma et al. *Nature*, 393:272-276 (1998); T. Sakurai et al. *Cell*, 92:573-585 (1998); J. C. Meunier et al. *Nature*, 377 (6549) 532-535 (1995) ] もあるが、まだその数が少ないと明らかに容易なこと  
5 ではない。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（即ち、リガンド）の探索、また該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニスト）の探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセ  
10 プターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

15 さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または亢進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子  
20 治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

## 25 発明の開示

本発明は、上記のように有用なヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。即ち、ヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RN

Aおよびそれらの誘導体)を含有するポリヌクレオチド(DNA、RNAおよびそれらの誘導体)、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

本発明者らは、銳意研究を重ねた結果、degenerated PCR法によって作成したEST情報に基づいて、ヒト由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列である前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

- (3) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (4) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 5 (5) DNAである前記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (6) 配列番号:3または配列番号:4で表される塩基配列を有する前記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (7) 前記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- (8) 前記(7)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- 10 (9) 前記(8)記載の形質転換体を培養し、前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
- (10) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- 15 (11) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である前記(10)記載の抗体、
- (12) 前記(10)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (13) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られる前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、
- 20 (14) 前記(13)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを含有してなる医薬、
- (15) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- 25 (16) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (17) 前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは前記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 5 (18) 前記(16)記載のスクリーニング方法または前記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- (19) 前記(16)記載のスクリーニング方法または前記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- 10 (20) 前記(4)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- 15 (21) 前記(4)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列およびその一部を含有してなるポリヌクレオチド、
- (22) 前記(4)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法、
- 20 (23) 前記(10)記載の抗体を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法、
- (24) 前記(22)または前記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能が関連する疾患の診断方法、
- 25 (25) 前記(22)記載の定量方法を用いることを特徴とする、前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (26) 前記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜における前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物

またはその塩のスクリーニング方法、

(27) 前記(25)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、

5 (28) 前記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜における前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩などに関する。

さらには、

(29) 蛋白質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

20 (30) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(15)記載のリガンドの決定方法、

(31) リガンドが例えばアンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、

ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$  および  $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、5 MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまたはガラニンである上記(30)記載のリガンドの決定方法、(32)(i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接觸させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接觸させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記(16)記載のスクリーニング方法、(33)(i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に接觸させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に接觸させた場合における、標識したリガンドの上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(34)(i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接觸させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接觸させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の

スクリーニング方法、

- (35) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (36) (i) 標識したリガンドを上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (37) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (38) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化

する化合物および試験化合物を上記（8）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接觸させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

（39）上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまたはガラニンである上記（37）または（38）記載のスクリーニング方法。

（40）上記（32）～（39）記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（41）上記（32）～上記（39）記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（42）上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（17）記載のスクリーニング用キット、

- (43) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(17)記載のスクリーニング用キット、
- (44) 上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の5 細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記(17)記載のスクリーニング用キット、
- (45) 上記(42)～(44)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- 10 (46) 上記(42)～(44)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
- (47) 上記(10)記載の抗体と、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記(1)のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、
- 15 (48) 上記(10)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および
- 20 (49) 被検液と担体上に不溶化した上記(10)記載の抗体および標識化された上記(10)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

### 図面の簡単な説明

図1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列をもとに作成した、本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。

- 5 図2は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する本発明G蛋白質共役型  
レセプター蛋白質とMASのアミノ酸配列の相同性比較を示す。図中、上段が  
本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質、下段がMASのアミノ酸配列を示す。

### 発明の実施をするための最良の形態

- 10 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、レセプター蛋白質と略記  
する場合がある）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは  
実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配  
列等）を含有するレセプター蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、单球）、  
20 巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脑基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脑皮質、延髓、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染、黒質）、脊髓、下垂体、胃、臍臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するタンパク質であつてもよく、また合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。
- 10 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質として、より具体的には、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））

のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：

- 5 1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプタタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- 20 さらに、本発明のレセプタタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したものの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わ

されるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト海馬由来）のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドで  
5 あれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、図1で示される疎水性プロット解析において細  
10 胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用  
いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数  
のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白  
15 質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、  
より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好  
ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約9  
0%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

20 ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同  
質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好  
ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸  
が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～  
25 20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5  
個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上  
(好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～  
5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）

またはカルボキシレート ( $-COO^-$ ) であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド ( $-CONH_2$ ) またはエステル ( $-COOR$ ) であってもよい。

- さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と  
5 同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、  
N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内  
のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは  
糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基 ( $-COOH$ )  
10 またはカルボキシレート ( $-COO^-$ ) であるが、前記した本発明のタンパク質  
のごとく、C末端がアミド ( $-CONH_2$ ) またはエステル ( $-COOR$ ) であってもよい。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または  
塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される  
15 酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リ  
ン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、ブ  
ロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、  
蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用い  
られる。

- 20 本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞  
または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造すること  
もできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有す  
る形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の  
タンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 25 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織  
または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相ク  
ロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー  
を組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそ

のアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOEt、HOOEt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOEtエステルあるいはHOOEtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが

用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。  
5 反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシリ、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-

2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、  
5 2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOEt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd 黒あるいは Pd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタシスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末

端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。

5 縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、

10 タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、

15 固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- 20 ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- 25 ④矢島治明 および榎原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部

分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列と約70以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以

上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70°C、好ましくは約60~65°Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65°Cの場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。こうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質

共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及びG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド(蛋白質)との間で「対応する」とは、ヌクレオチド(核酸)の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド(蛋白質)のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ペースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー)又は特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド(又は非修飾オリゴヌクレオチド)、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、

- メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーリーL-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターラント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al.,

Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。
- アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

- 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、

前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

- 5 (1) 配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2)配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

- 10 配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA  
15 などが用いられる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライプラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-G(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたは5 TAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することに10より製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニア15ウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞20を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lac25プロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモ

ーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること5ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択10マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、<sup>15</sup>α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを20含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・

モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969)]、C600〔ジエネティックス(Genetics)、39巻、440(1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス(*Bacillus subtilis*) M114〔ジーン、24巻、255(1983)〕、207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) N10 CYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス(*Pichia pastoris*)などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(*Bombyx mori* N; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J. L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー(Nature)、315巻、592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスATT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、69巻、2110(1972)やジーン

(Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

5 酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユニエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 15 52巻, 456(1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カゼミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in

Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約5~3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユニエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)】や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユニエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)】が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)), DMEM培地 (ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)), 199培地 (プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding

of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。  
5

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、  
培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、  
10 超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を  
破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法  
などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性  
剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液  
中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方  
15 法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター  
蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことが  
できる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解  
度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリア  
20 クリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオ  
ン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーク  
ロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマト  
グラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点  
の差を利用する方法などが用いられる。

25 かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知  
の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で  
得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体ま  
たは他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が產生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適當

な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

5 かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したりガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を  
10 認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造  
15 法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### (a) モノクロナール抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して  
20 抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントア  
ジュvantを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10  
回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イ  
ヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよ  
びラットが好ましく用いられる。

25 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、  
例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に  
脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と  
融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製するこ  
とができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋

白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法(ネイチャー(Nature)、256巻、495頁(1975年))に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレン  
5 リコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEG  
Gが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG  
10 (好ましくは、PEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。  
20

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))またはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、  
25

好ましくは約37°Cである。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

5 (b) モノクロナール抗体の精製

モノクロナール抗体の分離精製は、通常のポリクロナール抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクロナール抗体の作製〕

本発明のポリクロナール抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等の抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクロナール抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは

は担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

- 5 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうこと

10 ができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、

- (1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、(3) 遺伝子診断剤、(4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、  
15 (6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法、  
(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、(8) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(12) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による

中和、(13)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な5 G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発10明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

15 (1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

20 すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、プラジキニン、C

GRP (カルシトニンジンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パ  
ンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アド  
レナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO  
 $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、G  
5 CP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、M  
IP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒス  
タミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまた  
はガラニンなど) の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、マウス、ラ  
ット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど) の組織抽出物、細胞培養上清などが用  
10 いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に单一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性) を有する化合物 (例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその塩を決定する方法である。  
20

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。  
25

より具体的には、本発明は、

- ①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対

する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

- ②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- ③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、
- ④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および
- ⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発

明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、  
5 該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく  
10 発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で  
15 行なうことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Ervehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやボリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3$ ～ $10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5$ ～ $10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適當なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、[ $^3$ H]、[ $^{125}$ I]、[ $^{14}$ C]、[ $^{35}$ S]などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モ

チリン、アミリン、プラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$  および  $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-5、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HCl4、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまたはガラニンなどが好適である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくは pH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチド、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは $\gamma$ -カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対

するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

### 1. リガンド決定用試薬

#### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

#### ②G 蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個／穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

- 5 市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

10 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液15を各穴に加える。
- ②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るために非標識試験化合物を5μl加えておく。
- ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチ20レーターA（和光純薬製）と混合する。
- ④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、臍臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティ

ナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$  および  $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HCl4、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニンなどが用いられる。

10 (2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

上記(1)の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、②(イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。即ち、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質は、G蛋白共役型レセプター蛋白質の一種であるMASとアミノ酸配列レベルで約30%の相同性が認められる。MAS遺伝子

欠損マウスに不安の昂進等の中権機能の変化が認められたとの報告〔J. B. C., 273 (No. 19), 11867-11873 (1998)〕があることから、M A S 遺伝子は中権機能発現に何らかのはたらきがあると考えられる。従って、M A S と相同性が認められる本発明のレセプター蛋白質は、中権機能の不全に関連する疾患（例えば、  
5 不安症、分裂病、躁鬱病、痴呆症、精神遅滞および運動障害を包含する精神病など）の予防および／または治療に有用である。ラットのM A S 遺伝子の発現が生後直後に末梢の種々の臓器で高い発現を示し、成熟後は中権以外では精巣で高い発現を示すとの報告[FEBS Lett. 357:27-32 (1995)]があることから、細胞の増殖・機能の獲得および生殖に重要な役割があると考えられる。従って、M  
10 A S と相同性が認められる本発明のレセプター蛋白質は、呼吸器疾患・循環器疾患・消化管疾患・肝/胆/膵疾患・内分泌疾患の予防および／または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

15 一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、その  
20 ままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実際に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。  
25

これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるよう  
にするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラ  
チン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セ  
5 ルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのよ  
うな膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサ  
ッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのよう  
な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイ  
10 プの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のため  
の無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油など  
のような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に  
従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、  
ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ  
ンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例え  
15 ば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコ  
ール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベー  
ト 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、  
ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジ  
ルアルコールなどと併用してもよい。
- 20 また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢  
酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ  
カインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコー  
ルなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防  
止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填  
25 される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺  
乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルな  
ど）に対して投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方

法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なる  
5 が、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによ  
り差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）において  
10 は、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、よ  
り好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1  
回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例  
えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約  
15 0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましく  
は約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の  
動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

### （3）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動  
物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）  
20 における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDN  
AまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、  
該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたは  
mRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

25 本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザン  
ハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）,  
第5巻, 874～879頁（1989年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナ  
ショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings  
of the National Academy of Sciences of the United States of America）,

第86巻、2766～2770頁（1989年）などにより実施することができる。

（4）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

5 本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、（i）非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または（ii）形質転換体等に含まれる  
10 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

15 （i）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間  
20 経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えばTaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の  
25 手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは3  
5分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、  
10 細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、  
(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行  
15 なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、  
20 (ロ) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾患の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防およ

び／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターーチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターーチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサツカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ

カインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

- 20 本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

25 ①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「統ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質

等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- 5 このような化合物には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の  
10 レセプター蛋白質に対するアゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、(ハ) リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(二) リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記(イ)の化合物は、  
15 上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、(i) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。  
20

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

25 より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との

- 結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ②標識したりガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したりガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したりガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ③標識したりガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したりガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したりガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜

上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接觸させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、5 pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G 蛋白質共役型レセプター AGONIST または ANTAGONIST をスクリーニングする場合、まずラットなどの G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトの G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対する AGONIST または ANTAGONIST を実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドと G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物が AGONIST か ANTAGONIST かを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、

本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いててもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由來のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行なうことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 卷, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のによる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠

心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3$ ～ $10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5$ ～ $10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したりガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したりガンドとしては、標識したりガンド、標識したりガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば [ $^3\text{H}$ ] 、 [ $^{125}\text{I}$ ] 、 [ $^{14}\text{C}$ ] 、 [ $^{35}\text{S}$ ] などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、T ween-80<sup>TM</sup>（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによ

- るレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMS F、ロイペプチド、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01mI～10mIの該レセプター溶液に、一定量（5000c pm～500000c pm）の標識したリガンドを添加し、同時に10<sup>-4</sup>M～10<sup>-10</sup>Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは $\gamma$ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B<sub>0</sub>）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B<sub>0</sub>-NSB）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。
- リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。
- 具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォ

ルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であつてもよい。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5 × 10<sup>5</sup>個/穴で継代し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識リガンド

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釀する。

## ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20°Cで保存する。

## 2. 測定法

- 5 ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CH  
○細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液  
を各穴に加える。
- 10 ② $10^{-3}$ ~ $10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5  
μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るために試験化  
合物の代わりに $10^{-3}$ Mのリガンドを5μl加えておく。
- 15 ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標  
識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレ  
ーターA(和光純薬製)と混合する。
- ④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測  
定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

20 NSB : Non-specific Binding(非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られ  
る化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性  
25 を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)G蛋白質共役型  
レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリ  
ン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノ  
シトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos  
の活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する

化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（二）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法な

どにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、  
5 例えれば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

（8）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病的予防および／または治療剤  
10

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／  
15 または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

20 例えれば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。  
25

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えゼラチン、コーンスターーチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セ

ルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、

例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

5 (9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例10 えば、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、  
(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性15 を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供する。

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

20 本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')  
2、F(ab')<sup>2</sup>、あるいはF(ab)画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白25 質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメ

トリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、  
5 例えれば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物  
10 質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

25 また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白

質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

- 5 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」

(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)  
(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)  
(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモノジー (Methods  
in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol.  
5 73(Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical  
Techniques (Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part  
D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part  
E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol.  
10 121(Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal  
Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。  
10

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。  
15

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明  
20 のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセ  
25 プター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明

のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、  
5  
(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。  
10  
(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。  
15

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面  
20  
25

活性剤（例えば、トリトンX 100<sup>TM</sup>、ツイーン20<sup>TM</sup>など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやボリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンプロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は前述の方法と同様にして行なうことができ、ウエスタンプロットは自体公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、

好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、  
5 一定時間培養後(1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

- 10 (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。  
15 細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生

成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(口)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる  
5 化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理  
10 活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、  
15 上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。  
20

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~1.00mg、好ましくは約1.0~5.0mg、より好ましくは約1.0~2.0mgである。非経口的に投与する場合は、その  
25 1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~3.0mg程度、好ましくは約0.1~2.0mg程度、より好ましくは約0.1~1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターーチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターーチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ

ンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、  
5 ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。  
10

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。  
15

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その  
20 1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。  
25 (12) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体が、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、即ち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従つ

て、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。従って、該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

（13）本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を有する非ヒト動物の作製

本発明の DNA を用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明の DNA を対象動物に転移させるにあたっては、該 DNA を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明の DNA を転写させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明の DNA を動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生する DNA 転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現する NGF 遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明の DNA の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する

ことを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。

- 5 さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

- 本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

c DNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
5	mRNA	: メッセンジャー リボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシチジン三リン酸
10	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
15	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
20	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
25	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン

	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン
	pGlu	: ピログルタミン酸
5	Me	: メチル基
	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

10 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表

記

する。

	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
15	BzI	: ベンジル
	Cl <sub>2</sub> BzI	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C1-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
20	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェノール
	Trt	: トリチル
	Bum	: t-ブトキシメチル
25	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOOBt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド

DCC : N、N' -ジシクロヘキシリカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hH I 7 T 2 1 3の  
5 アミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hH I 7 T 2 1 3 V  
のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：3]

10 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hH I 7 T 2 1 3をコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：4]

15 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hH I 7 T 2 1 3 VをコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

20 本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hH I 7 T 2 1 3をコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基配列を示す。

[配列番号：6]

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hH I 7 T 2 1 3をコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー2の塩基配列を示す。

25 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒアコリ(Escherichia coli)DH5 $\alpha$ /pCRII-hH I 7 T 2 1 3は、平成10年9月4日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-6484として、平成10年6月19日から財団法人・発酵研究所IFO)に寄託番号IFO 16187として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

5 実施例1 ヒト由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするc DN  
Aのクローニングと塩基配列の決定

ヒト海馬c DNA (Marathon-Ready™ c DNA、CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号：5) およびプライマー2 (配列番号：6) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記c DNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advanced c DNA Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1 (配列番号：5) およびプライマー2 (配列番号：6) を各0.2 μM、dNTPs 200 μM、および酵素に添付のバッファーを加え、25 μlの液量とした。PCR反応は、① 95°C・1分の後、② 94°C・20秒、72°C・2分のサイクルを3回、③ 94°C・20秒、68°C・2分20秒のサイクルを3回繰り返し、⑤ 最後に68°C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR II (Invitrogen社) へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、c DNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする2種のc DNA配列 (配列番号：3および配列番号：4)を得た。このc DNAより導き出されるアミノ酸配列 (配列番号：1および配列番号：2) のうち配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhH17T213と命名し、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhH17T213Vと命名した。

本発明のヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質hH17T213

をコードする cDNA (配列番号: 3) がサブクローニングされたプラスミド pCRII-hHI7T213 を、自体公知の方法に従い大腸菌 (Escherichia coli) DH5 $\alpha$  に導入して、形質転換体：大腸菌 (Escherichia coli) DH5 $\alpha$  / pCRII-hHI7T213を得た。

5

#### 実施例2 hHI7T213発現CHO細胞の作製

実施例1で作製した形質転換体 E.coli DH5 $\alpha$  / pCRII-hHI7T213を培養後、プラスミド・ミドキット（キアゲン社）を用いて pCRII-hHI7T213 のプラスミドDNAを調製した。このプラスミドから本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 hHI7T213をコードする cDNA をタンパク発現用プラスミドベクター pcDNA3.1/V5/His ヘクローニングしてタンパク発現用プラスミド pcDNA3.1-hHI7T213を構築した。このようにして得たプラスミドは、プラスミド・ミドキット（キアゲン社）を用いて大量にプラスミドDNAを調製した後、これをセルフェクト・トランスフェクションキット（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用い添付のプロトコールに従って CHO dhfr $^{-}$ 細胞に導入した。すなわち、10mgのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に  $5 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  個の CHO dhfr $^{-}$  細胞を播種した 10 cm シャーレに添加した後、10%ウシ胎児血清を含む MEM $\alpha$  培地で1日間培養し、継代した後、選択培地である 0.4mg/ml の G418（ギブコ BRL 社）および 10%透析ウシ胎児血清を含む MEM $\alpha$  培地で培養した。選択培地中で増殖してくる形質転換細胞 (CHO/hHI7T213) のコロニーを選択することにより、hHI7T213発現CHO細胞とした。

選択した hHI7T213 発現 CHO 細胞から常法に従い全 RNA を抽出した後、TaqMan 法により hHI7T213 の mRNA 量を測定・コピー数を算出した。

25 結果を下表に示す。

表1

クローンNo.	発現量(コピー/ng 全RNA)	
	1回目測定	2回目測定
8	4780	8145
	10916	8956
12	44105	67482
	47085	65845
13	16663	20810
	18033	20404

## 産業上の利用可能性

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは  
 5 その塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレ  
 オチド(例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体)は、①リガンド(ア  
 ゴニスト)の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白  
 質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医  
 薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプター  
 10 との比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプロー  
 ブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製  
 または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
3. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはそ  
10 の塩。
4. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を有する請求項4記  
15 載のポリヌクレオチド。
7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のG蛋白質共役型レセ  
20 プター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
10. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
11. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項10記載の抗体。
- 25 12. 請求項10記載の抗体を含有してなる診断薬。
13. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られる請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。
14. 請求項13記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを含有し

てなる医薬。

15. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

5 16. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 17. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

15 18. 請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

19. 請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

20 20. 請求項4記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

21. 請求項4記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列およびその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

22. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法。

23. 請求項10記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法。

24. 請求項22または請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能が関連する疾患の診断方

法。

25. 請求項22記載の定量方法を用いることを特徴とする、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

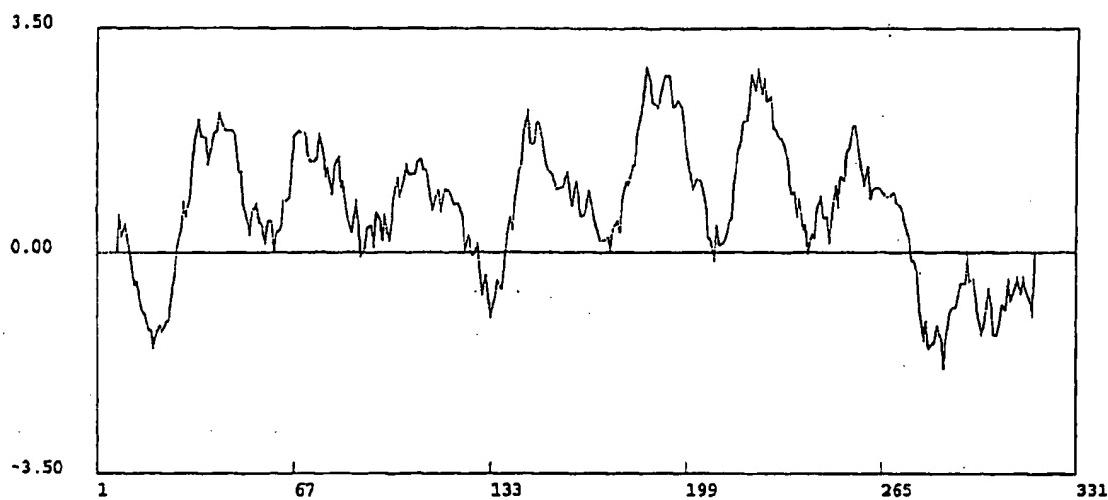
5 26. 請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

27. 請求項25記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその  
10 塩。

28. 請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩。

1

Parameter : Kyte & Doolittle  
Range to Average : 15



☒ 2

37 VSLVALTGNAVVLWLLGCRMRRNAVSIYILNLVAADFLFLSGHIICS... 83

:| :::| :||:| |||| :|| :| ||:| :| :||

41 ISPLGFVENGILLWFLCFRMRRNPFTVYITHLSIADISLLFCIFILSIDY 90

84 .. PLRLINIRHPISKILSPVMTFPYFIGLSMMLSAISTERCLSILWPIWYH 131

:| : ::|| :| | || :|:||:||||:|:|||:

91 ALDYELSSGHYYTIVTLSVTFLFGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYPIWYR 140

132 CRRPRYLSSVMCVLLWALSLLRSILEWMFCDFLFGADSVWCETSD... 177

|:||:|:|:||||| | :|:||:| :|| :| :||

141 CHRPKHQSAFVCALLWALSCLVTTMEYVMC..IDSGEES..HSQSDCRAV 186

178 .. FITI.AWLVFLCVVLCGSSLVLLVRILCGSRKMPTRLYVTILLTVLV 224

|:|:| :||| :| | || :|:||| :| :|||:|:|:|:|

187 IIFIAILSFLVFTPLMLV.SSTILVVKIRKNTWASHSSKLYIVIMVTIII 235

225 FLLCGLPFGIQWALFSRIHLDWKVLFCHVHLVSIFLSALNSSANPIIYFF 274

|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|

236 FLIFAMPMRVLYLLYYEY..WST.FGNLHNISLLFSTINSSANPFIYFF 281

275 VGSFRQRQRQNLKLVLRALQD..TPEVDEGGG 306

|:| :::| :||:|| |:|:| |:| :||:|

282 VGSSKKRFRESLKVVLTAFKDEMQRQQEGNG 315

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G-Protein Coupled Receptor Protein and its DNA

<130> A98152

<150> JP 10-279535

<151> 1998-10-01

<160> 6

<210> 1

<211> 322

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asp Ser Thr Ile Pro Val Leu Gly Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn

5 10 15

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Gly

20 25 30

Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Ala Leu Thr Gly Asn Ala Val Val

35 40 45

Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr

50 55 60

Ile Leu Asn Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly His Ile

65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Arg His Pro Ile Ser Lys

85 90 95

Ile Leu Ser Pro Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Met

100 105 110

Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Ile Leu Trp Pro Ile

115 120 125

Trp Tyr His Cys Arg Arg Pro Arg Tyr Leu Ser Ser Val Met Cys Val  
130 135 140  
Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Phe  
145 150 155 160  
Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Val Trp Cys Glu Thr Ser  
165 170 175  
Asp Phe Ile Thr Ile Ala Trp Leu Val Phe Leu Cys Val Val Leu Cys  
180 185 190  
Gly Ser Ser Leu Val Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys  
195 200 205  
Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val  
210 215 220  
Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser  
225 230 235 240  
Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val  
245 250 255  
Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr  
260 265 270  
Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys  
275 280 285  
Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly  
290 295 300  
Gly Gly Trp Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu  
305 310 315 320  
Glu Gln  
322  
<210> 2  
<211> 322  
<212> PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

Met Asp Ser Thr Ile Pro Val Leu Gly Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn

5

10

15

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Gly

20

25

30

Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Ala Leu Thr Gly Asn Ala Val Val

35

40

45

Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr

50

55

60

Ile Leu Asn Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly His Ile

65

70

75

80

Ile Cys Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Arg His Pro Ile Ser Lys

85

90

95

Ile Leu Ser Pro Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Met

100

105

110

Leu Ser Ala Ile Ser Thr Gly Arg Cys Leu Ser Ile Leu Trp Pro Ile

115

120

125

Trp Tyr His Cys Arg Arg Pro Arg Tyr Leu Ser Ser Val Met Cys Val

130

135

140

Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Phe

145

150

155

160

Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asn Ser Val Trp Cys Glu Thr Ser

165

170

175

Asp Phe Ile Thr Ile Ala Trp Leu Val Phe Leu Cys Val Val Leu Cys

180

185

190

Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys

195

200

205

Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val  
210 215 220  
Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser  
225 230 235 240  
Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val  
245 250 255  
Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr  
260 265 270  
Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys  
275 280 285  
Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly  
290 295 300  
Gly Gly Trp Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu  
305 310 315 320  
Glu Gln  
322  
<210> 3  
<211> 969  
<212> DNA  
<213> Human  
<400> 3

ATGGATTCAA CCATCCAGT CTGGGTACA GAACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60  
ACTCCTTGCT ACAAGCAGAC CCTGAGCTTC ACGGGGCTGA CGTGCATCGT TTCCCTTGTC 120  
GCGCTGACAG GAAACGCGGT TGTGCTCTGG CTCCTGGCT GCCGCATGCG CAGGAACGCT 180  
GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGTCGCG GCCGACTTCC TCTTCCTTAG CGGCCACATT 240  
ATATGTTCGC CGTTACGCCCT CATCAATATC CGCCATCCCA TCTCCAAAAT CCTCAGTCCT 300  
GTGATGACCT TTCCCTACTT TATAGGCCTA AGCATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGCGC 360  
TGCCTGTCCA TCCTGTGGCC CATCTGGTAC CACTGCCGCC GCCCCAGATA CCTGTCATCG 420  
GTCATGTGTG TCCTGCTCTG GGCCCTGTCC CTGCTGCCGA GTATCCTGGA GTGGATGTTC 480

TGTGACTTCC TGTTAGTGG TGCTGATTCT GTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATTACA 540  
ATCGCGTGGC TGGTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGGGT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600  
AGGATTCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTCCTC 660  
ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGTGGCCTG CCCTTTGGCA TTCAGTGGGC CCTGTTTCC 720  
AGGATCCACC TGGATTGGAA AGTCTTATTG TGTCATGTGC ATCTAGTTTC CATTTCCTG 780  
TCCGCTCTTA ACAGCAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTTAGGCAG 840  
CGTCAAATA GGCAAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CACGCCTGAG 900  
GTGGATGAAG GTGGAGGGTG GCTTCCTCAG GAAACCTGG AGCTGTGGG AAGCAGATTG 960  
GAGCAGTGA 969

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 969

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

ATGGATTCAA CCATCCCAGT CTTGGGTACA GAACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60  
ACTCCTTGCT ACAAGCAGAC CCTGAGCTTC ACGGGGCTGA CGTGCATCGT TTCCCTTGTG 120  
GCGCTGACAG GAAACGCGGT TGTGCTCTGG CTCCCTGGCT GCCGCATGCG CAGGAACGCT 180  
GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGTCGCG GCCGACTTCC TCTTCCTTAG CGGCCACATT 240  
ATATGTTCGC CGTTACGCCT CATCAATATC CGCCATCCCA TCTCCAAAAT CCTCAGTCCT 300  
GTGATGACCT TTCCCTACTT TATAGGCCTA AGCATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGGCC 360  
TGCCTGTCCA TCCTGTGGCC CATCTGGTAC CACTGCCGCC GCCCCAGATA CCTGTCATCG 420  
GTCATGTGTG TCCTGCTCTG GGCCCTGTCC CTGCTGGGA GTATCCTGGA GTGGATGTTC 480  
TGTGACTTCC TGTTAGTGG TGCTAATTCT GTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATTACA 540  
ATCGCGTGGC TGGTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGGGT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600  
AGGATTCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTCCTC 660  
ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGTGGCCTG CCCTTTGGCA TTCAGTGGGC CCTGTTTCC 720  
AGGATCCACC TGGATTGGAA AGTCTTATTG TGTCATGTGC ATCTAGTTTC CATTTCCTG 780  
TCCGCTCTTA ACAGCAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTTAGGCAG 840  
CGTCAAATA GGCAAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CACGCCTGAG 900

GTGGATGAAG GTGGAGGGTG GCTTCCTCAG GAAACCTGG AGCTGTGGG AAGCAGATTG 960

GAGCAGTGA 969

<210> 5

〈211〉 30

<212> DNA

### ⟨213⟩ Artificial Sequence

220

223

<400> 5

GTGACATGG ATTCAACCAT CCCAGTCTTG 30

〈210〉 6

<211> 30

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

220

<223>

<400> 6

ACTAGTTCAC TGCTCCAATC TGCTTCCCCGA

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05366

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50,  
A61K 45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50,  
A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-146192, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 02 June, 1998 (02.06.98) & WO, 9724436, A2 & EP, 870020, A2	1-28
A	JP, 9-278798, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 October, 1997 (28.10.97) & EP, 789076, A2	1-28
A	JP, 9-238686, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 September, 1997 (16.09.97) (Family: none)	1-28
A	JP, 9-70289, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 18 March, 1997 (18.03.97) (Family: none)	1-28

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 December, 1999 (10.12.99)

Date of mailing of the international search report  
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup>

C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup>

C07K 14/475, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-146192, A (武田薬品工業株式会社) 2.6月. 1998(02. 06. 98) & WO, 9724436, A2 & EP, 870020, A2	1-28
A	JP, 9-278798, A (武田薬品工業株式会社) 28.10月. 1997(28. 10. 97) & EP, 789076, A2	1-28
A	JP, 9-238686, A (武田薬品工業株式会社) 16.9月. 1997(16. 09. 97) ファミリーなし	1-28
A	JP, 9-70289, A (武田薬品工業株式会社) 18.3月. 1997(18. 03. 97) ファミリーなし	1-28

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 7 : <b>C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, A01K 67/027, C12N 15/62, C12Q 1/68, A61K 38/17, G01N 33/566</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 00/40724</b> (43) International Publication Date: <b>13 July 2000 (13.07.00)</b>
(21) International Application Number: <b>PCT/US00/00052</b>		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: <b>4 January 2000 (04.01.00)</b>			
(30) Priority Data: 60/114,666 4 January 1999 (04.01.99) US 60/115,828 14 January 1999 (14.01.99) US			
(71) Applicant: LEXICON GENETICS INCORPORATED [US/US]; 4000 Research Forest Drive, The Woodlands, TX 77381 (US).		Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(72) Inventors: NEHLS, Michael; Talackerstrasse, D-79279 Voerstetten (DE). WATTLER, Frank; Am Bahnhof 2, D-29640 Schneverdingen (DE).			
(74) Agents: GARRETT, Arthur, S. et al.; Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P., 1300 I Street N.W., Washington, DC 20005-3315 (US).			
(54) Title: HUMAN SEVEN-TRANSMEMBRANE RECEPTORS			
(57) Abstract <p>The nucleotide and amino acid sequences of several human seven transmembrane G protein coupled receptors are described.</p>			

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		

## NOVEL HUMAN SEVEN-TRANSMEMBRANE RECEPTORS

The present application claims priority to United States Provisional Application Serial Nos. 60/114,666 and 60/115,828, all of which are incorporated herein by reference in their entirety for any purpose.

### 1. Introduction

The present invention relates to the discovery, identification and characterization of novel human polynucleotides that encode membrane associated proteins and receptors. The invention encompasses the described polynucleotides, host cell expression systems, the encoded proteins, fusion proteins, polypeptides and peptides, antibodies to the encoded proteins and peptides, and genetically engineered animals that lack the disclosed genes, or over express the disclosed genes, or antagonists and agonists of the proteins, and other compounds that modulate the expression or activity of the proteins encoded by the disclosed genes that can be used for diagnosis, drug screening, clinical trial monitoring, and/or the treatment of physiological or behavioral disorders.

### 2. Background of the Invention

Membrane receptor proteins are integral components of the mechanisms through which cells sense their surroundings as well as maintain cellular homeostasis and function. Accordingly, membrane receptor proteins are often involved in signal transduction pathways that control cell physiology, chemical communication, and gene expression. A particularly relevant class of membrane receptors are those typically characterized by the presence of 7 conserved transmembrane domains that are interconnected by nonconserved hydrophilic loops. Such, "7TM receptors" include a superfamily of receptors known as G-protein coupled receptors (GPCRs). GPCRs are typically involved in signal transduction pathways involving G-proteins or PPG proteins. As such, the GPCR family includes many receptors that are known to serve as drug targets for therapeutic agents.

### 3. Summary of the Invention

The present invention relates to the discovery, identification and characterization of nucleotides that encode novel GPCRs (NGPCRs), and the corresponding NGPCR amino acid sequences. The GPCRs described herein are transmembrane proteins that span the cellular membrane and are involved in signal

transduction, for example, through ligand binding. The described GPCRs have structural motifs found in the 7TM receptor family. The GPCR mRNA transcripts are about 3.5 to about 4 kb in length, and are expressed in brain, kidney, testis, trachea cells, mammary gland, and salivary gland, among others. The human GPCRs described herein encode receptor proteins of 322 and 552 amino acids in length (see SEQ ID NOS:2 and 4, respectively). The described GPCRs have hydrophobic leader sequences, seven transmembrane regions (of about 20-30 amino acids each) typically seen in 7TM receptors, as well as several predicted cytoplasmic and extracellular domains.

Several of the murine homologs of the described novel GPCRs have also been identified and "knockout" ES cells are being produced using conventional methods (see, for example, PCT Applic. No. PCT/US98/03243, filed February 20, 1998, herein incorporated by reference). Accordingly, an additional aspect of the present invention includes knockout cells and animals having genetically engineered mutations in gene encoding the presently described NGPCRs.

The invention comprises (a) polypeptides with SEQ ID NOS:2 and 4; (b) homologues and allelic variants of SEQ ID NOS:2 or 4; (c) fragments of SEQ ID NOS:2 or 4; (d) fragments of SEQ ID NOS:2 or 4 that correspond to a functional domain (for example, a transmembrane domain (TM), a cytoplasmic domain (CD), an extracellular domain (ECD), a signal sequence, a ligand binding domain, etc.); (e) fusion proteins comprising a polypeptide sequence of any one of (a) through (d); (f) mutant polypeptides (including engineered and naturally occurring mutants) comprising a polypeptide sequence of any one of (a) through (d), including, but not limited to, mutant polypeptides in which all or a part of at least one of the domains is deleted or altered, including, but not limited to, soluble receptors in which all or a portion of the TM is deleted, and nonfunctional receptors in which all or a portion of the CD is deleted.

The invention further comprises (g) polynucleotides with SEQ ID NOS:1 and 3; (h) polynucleotides encoding any one of the polypeptides of the invention including, but not limited to, polypeptides specifically described in (a) through (f) above; (i) polynucleotides capable of hybridizing to a second polynucleotide that is

complementary to a polynucleotide described in (g) and/or (h) above under conditions of low, medium, or high stringency; (j) oligonucleotides corresponding to a segment of a polynucleotide described in (g) through (i) above.

The invention further comprises antibodies to any one of the polypeptides or polynucleotides of the invention. The invention also comprises host cells that were engineered to contain and/or express any one of the polynucleotides and/or polypeptides of the invention.

The invention also comprises agonists and antagonists of the NGPCRs including, but not limited to, small molecules, large molecules, mutant NGPCR proteins, or portions thereof, that compete with the native NGPCR, naturally occurring or engineered ligands of the NGPCRs and fragments thereof, and antibodies. The invention further comprises nucleotide sequences that can be used to inhibit the expression of the described NGPCRs (*e.g.*, antisense and ribozyme oligonucleotides and/or polynucleotides, and gene or regulatory sequence replacement constructs) or to enhance the expression of the described NGPCR gene (*e.g.*, expression constructs that place the described gene under the control of a strong promoter system), and transgenic animals that express a NGPCR transgene or "knock-outs" that do not express functional NGPCR.

Further, the present invention also relates to methods for the use of the described NGPCR gene and/or NGPCR gene products for the identification of compounds that modulate, *i.e.*, act as agonists or antagonists, of NGPCR gene expression and/or NGPCR gene product activity. Such compounds can be used as therapeutic agents for the treatment of various symptomatic representations of biological disorders or imbalances.

#### 4. Description of the Sequence Listing and Figures

The Sequence Listing show two NGPCR polynucleotides (SEQ ID NOS:1 and 3) and amino acid sequences encoded thereby (SEQ ID NOS:2 and 4).

### 5. Detailed Description of the Invention

The NGPCRs of the invention are novel receptor proteins that are expressed in different tissues and cells. For example, the gene corresponding to SEQ ID NO:1 is expressed, *inter alia*, in human testis, mammary gland, and salivary gland. The gene corresponding to SEQ ID NO:3, for example, is expressed, *inter alia*, in human brain, testis, kidney, and trachea cells. The NGPCRs are transmembrane proteins that fall within the 7TM family of receptors. As with other GPCRs, signal transduction is triggered when a ligand binds to the receptor. Interfering with the binding of the natural ligand, or neutralizing or removing the ligand, will effect NGPCR mediated signal transduction. Because of their biological significance, 7TM, and particularly GPCR, proteins have been subjected to intense scientific/commercial scrutiny (see, for example, U.S. Application Ser. Nos. 08/820,521, filed March 19, 1997, and 08/833,226, filed April 17, 1997, both of which are herein incorporated by reference in their entirety).

The invention encompasses the use of the described NGPCR nucleotides, NGPCR proteins and peptides, as well as antibodies, preferably humanized monoclonal antibodies, or binding fragments, domains, or fusion proteins thereof, to the NGPCRs (which can, for example, act as NGPCR agonists or antagonists), antagonists that inhibit receptor activity or expression, or agonists that activate receptor activity or increase its expression in the diagnosis and treatment of disease.

In particular, the invention described in the subsections below encompasses NGPCR polypeptides or peptides corresponding to functional domains of NGPCR (*e.g.*, ECD, TM or CD), mutated, truncated or deleted NGPCRs (*e.g.*, NGPCRs missing one or more functional domains or portions thereof, such as,  $\Delta$ ECD,  $\Delta$ TM and/or  $\Delta$ CD ( $\Delta$  means missing)), NGPCR fusion proteins (*e.g.*, a NGPCR or a functional domain of a NGPCR, such as the ECD, fused to an unrelated protein or peptide such as an immunoglobulin constant region, *i.e.*, IgFc), nucleotide sequences encoding such products, and host cell expression systems that can produce such NGPCR products.

The invention also encompasses antibodies and anti-idiotypic antibodies (*including* Fab fragments), antagonists and agonists of the NGPCR, as well as

compounds or nucleotide constructs that inhibit expression of a NGPCR gene (transcription factor inhibitors, antisense and ribozyme molecules, or gene or regulatory sequence replacement constructs), or promote expression of NGPCR (*e.g.*, expression constructs in which NGPCR coding sequences are operatively associated with expression control elements such as promoters, promoter/enhancers, etc.). The invention also relates to host cells and animals genetically engineered to express the human NGPCRs (or mutants thereof) or to inhibit or "knock-out" expression of at least one allele of the animal's endogenous NGPCR genes.

The NGPCR proteins or peptides, NGPCR fusion proteins, NGPCR nucleotide sequences, antibodies, antagonists and agonists can be useful for the detection of mutant NGPCRs or inappropriately expressed NGPCRs for the diagnosis of disease. The NGPCR proteins or peptides, NGPCR fusion proteins, NGPCR nucleotide sequences, host cell expression systems, antibodies, antagonists, agonists and genetically engineered cells and animals can be used for screening for drugs (or high throughput screening of combinatorial libraries) effective in the treatment of the symptomatic or phenotypic manifestations of perturbing the normal function of NGPCR in the body. The use of engineered host cells and/or animals may offer an advantage in that such systems allow not only for the identification of compounds that bind to an ECD of a NGPCR, but can also identify compounds that affect the signal transduced by an activated NGPCR.

Finally, the NGPCR protein products (especially soluble derivatives such as peptides corresponding to the NGPCR ECD, or truncated polypeptides lacking one or more TM domains) and fusion protein products (especially NGPCR-Ig fusion proteins, *i.e.*, fusions of a NGPCR, or a domain of a NGPCR, *e.g.*, ECD,  $\Delta$ TM to an IgFc), antibodies and anti-idiotypic antibodies (including Fab fragments), antagonists or agonists (including compounds that modulate signal transduction which may act on downstream targets in a NGPCR-mediated signal transduction pathway) can be used for therapy of diseases related to a function or an abnormal function of a NGPCR. For example, the administration of an effective amount of soluble NGPCR ECD,  $\Delta$ TM, or an ECD-IgFc fusion protein or an anti-idiotypic antibody (or its Fab) that mimics the NGPCR ECD would "mop up" or "neutralize" the endogenous NGPCR ligand, and

prevent or reduce binding and receptor activation. Nucleotide constructs encoding such NGPCR products can be used to genetically engineer host cells to express such products *in vivo*; these genetically engineered cells function as "bioreactors" in the body delivering a continuous supply of a NGPCR, a NGPCR peptide, soluble ECD or  $\Delta$ TM or a NGPCR fusion protein that will "mop up" or neutralize a NGPCR ligand. Nucleotide constructs encoding functional NGPCRs, mutant NGPCRs, as well as antisense and ribozyme molecules can be used in "gene therapy" approaches for the modulation of NGPCR expression. Thus, the invention also encompasses pharmaceutical formulations and methods for treating biological disorders.

Various aspects of the invention are described in greater detail in the subsections below.

### 5.1 The NGPCR Genes

NGPCR cDNA sequences (SEQ ID NOS:1 and 3) and deduced amino acid sequences (SEQ ID NOS:2 and 4) of human are presented in the Sequence Listing.

NGPCRs of the invention include, but are not limited to, the human DNA sequences presented in the Sequence Listing and any nucleotide sequence that hybridizes to a complement of the DNA sequences presented in the Sequence Listing under highly stringent conditions and that (a) encodes a naturally occurring polypeptide or that (b) comprises a contiguous and functional NGPCR open reading frame (ORF) which encodes a functionally equivalent gene product (for example, a GPCR). An example of highly stringent hybridization conditions is hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (Ausubel F.M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York, at p. 2.10.3). Additionally contemplated are any nucleotide sequences that hybridize to the complement of the DNA sequences that encode and express an amino acid sequence presented in the Sequence Listing under moderately stringent conditions, e.g., washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C (Ausubel et al., 1989, *supra*), yet which still encode a functionally equivalent NGPCR gene product. Functional equivalents of NGPCR include naturally occurring NGPCRs present in other species, and mutant NGPCRs whether naturally occurring

or engineered. The invention also includes degenerate variants of the disclosed sequences.

The invention also includes nucleic acid molecules, preferably DNA molecules, that hybridize to, and are therefore the complements of, the described NGPCR nucleotide sequences. Such hybridization conditions may be highly stringent or less highly stringent, as described above. In instances wherein the nucleic acid molecules are deoxyoligonucleotides ("DNA oligos"), such molecules (and particularly about 16 to about 100 bases long, about 20 to about 80 bases, or about 34 to about 45 bases long, or about 23 bases long, or any variation or combination of sizes represented therein incorporating a contiguous region of sequence disclosed in the present Sequence Listing) can be used in conjunction with the polymerase chain reaction (PCR) to screen libraries, isolate clones, and prepare cloning and sequencing templates, etc. Alternatively, the oligonucleotides can be used as hybridization probes. For oligonucleotide probes, highly stringent conditions may refer, e.g., to washing in 6xSSC/0.05% sodium pyrophosphate at 37°C (for 14-base oligos), 48°C (for 17-base oligos), 55°C (for 20-base oligos), and 60°C (for 23-base oligos). These nucleic acid molecules may encode or act as NGPCR antisense molecules, useful, for example, in NGPCR gene regulation (or, for example, as antisense primers in amplification reactions of NGPCR gene nucleic acid sequences). With respect to NGPCR gene regulation, such techniques can be used to regulate biological functions. Further, such sequences may be used as part of ribozyme and/or triple helix sequences, also useful for NGPCR gene regulation.

Additionally, the antisense oligonucleotides may comprise at least one modified base moiety which is selected from the group including, but not limited to, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-

D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine.

The antisense oligonucleotide may also comprise at least one modified sugar moiety selected from the group including but not limited to arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose.

In certain embodiments, the antisense oligonucleotide comprises at least one modified phosphate backbone selected from the group consisting of a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, and a formacetal or analog thereof.

In certain embodiments, the antisense oligonucleotide is an  $\alpha$ -anomeric oligonucleotide. An  $\alpha$ -anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\beta$ -units, the strands run parallel to each other (Gautier *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641). The oligonucleotide is a 2'-0-methylribonucleotide (Inoue *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.*, 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

Oligonucleotides of the invention may be synthesized by standard methods known in the art, e.g. by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein *et al.* (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.

Low stringency conditions are well known to those of skill in the art, and will vary predictably depending on the specific organisms from which the library and the labeled sequences are derived. For guidance regarding such conditions see, for

example, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (and periodic updates thereof), Cold Springs Harbor Press, N.Y.; and Ausubel *et al.*, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

Suitably labeled NGPCR nucleotide probes may be used to screen a human genomic library using appropriately stringent conditions or by PCR. The identification and characterization of human genomic clones is helpful for identifying polymorphisms, determining the genomic structure of a given locus/allele, and designing diagnostic tests. For example, sequences derived from regions adjacent to the intron/exon boundaries of the human gene can be used to design primers for use in amplification assays to detect mutations within the exons, introns, splice sites (*e.g.*, splice acceptor and/or donor sites), etc., that can be used in diagnostics and pharmacogenomics.

Further, a NGPCR gene homolog may be isolated from nucleic acid of the organism of interest by performing PCR using two degenerate oligonucleotide primer pools designed on the basis of amino acid sequences within the NGPCR gene product disclosed herein. The template for the reaction may be total RNA, mRNA, and/or cDNA obtained by reverse transcription of mRNA prepared from, for example, human or non-human cell lines or tissue, such as testis, known or suspected to express a NGPCR gene allele.

The PCR product may be subcloned and sequenced to ensure that the amplified sequences represent the sequence of the desired NGPCR nucleic acid. The PCR fragment may then be used to isolate a full length cDNA clone by a variety of methods. For example, the amplified fragment may be labeled and used to screen a cDNA library, such as a bacteriophage cDNA library. Alternatively, the labeled fragment may be used to isolate genomic clones via the screening of a genomic library.

PCR technology may also be utilized to isolate full length cDNA sequences. For example, RNA may be isolated, following standard procedures, from an appropriate cellular or tissue source (*i.e.*, one known, or suspected, to express a NGPCR gene, such as, for example, brain tissue). A reverse transcription (RT)

reaction may be performed on the RNA using an oligonucleotide primer specific for the most 5' end of the amplified fragment for the priming of first strand synthesis. The resulting RNA/DNA hybrid may then be "tailed" using a standard terminal transferase reaction, the hybrid may be digested with RNase H, and second strand synthesis may then be primed with a complementary primer. Thus, cDNA sequences upstream of the amplified fragment may easily be isolated. For a review of cloning strategies which may be used, see e.g., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

A cDNA of a mutant NGPCR gene may be isolated, for example, by using PCR. For example, the first cDNA strand may be synthesized by hybridizing an oligo-dT oligonucleotide to mRNA isolated from tissue known or suspected to be expressed in an individual putatively carrying a mutant NGPCR allele, and by extending the new strand with reverse transcriptase. The second strand of the cDNA is then synthesized using an oligonucleotide that hybridizes specifically to the 5' end of the normal nucleic acid. Using these two primers, the product is then amplified via PCR, optionally cloned into a suitable vector, and subjected to DNA sequence analysis through methods well known to those of skill in the art. By comparing the DNA sequence of the mutant NGPCR allele to that of the normal NGPCR allele, the mutation(s) responsible for the loss or alteration of function of the mutant NGPCR gene product can be ascertained.

Alternatively, a genomic library can be constructed using DNA obtained from an individual suspected of or known to carry the mutant NGPCR allele, or a cDNA library can be constructed using RNA from a tissue known, or suspected, to express the mutant NGPCR allele. A normal NGPCR gene, or any suitable fragment thereof, can then be labeled and used as a probe to identify the corresponding mutant NGPCR allele in such libraries. Clones containing the mutant NGPCR gene sequences may then be purified and subjected to sequence analysis according to methods well known to those of skill in the art.

Additionally, an expression library can be constructed utilizing cDNA synthesized from, for example, RNA isolated from a tissue known, or suspected, to express a mutant NGPCR allele in an individual suspected of or known to carry such a mutant allele. In this manner, gene products made by the putatively mutant tissue may

be expressed and screened using standard antibody screening techniques in conjunction with antibodies raised against the normal NGPCR gene product, as described, below, in Section 5.3. (For screening techniques, see, for example, Harlow, E. and Lane, eds., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.)

Additionally, screening can be accomplished by screening with labeled NGPCR fusion proteins, such as, for example, AP-NGPCR (*i.e.*, alkaline phosphatase-NGPCR) or NGPCR-AP fusion proteins (to identify, for example, GPCRs or GPCR ligands). In cases where a NGPCR mutation results in an expressed gene product with altered function (*e.g.*, as a result of a missense or a frameshift mutation), a polyclonal set of antibodies to NGPCR are likely to cross-react with the mutant NGPCR gene product. Library clones detected via their reaction with such labeled antibodies can be purified and subjected to sequence analysis according to methods well known to those of skill in the art.

The invention also encompasses nucleotide sequences that encode mutant NGPCRs, peptide fragments of the NGPCRs, truncated NGPCRs, and NGPCR fusion proteins. These include, but are not limited to nucleotide sequences encoding mutant NGPCRs described in section 5.2 *infra*; polypeptides or peptides corresponding to one or more ECD, TM and/or CD domains of the NGPCR or portions of these domains; truncated NGPCRs in which one or two of the domains is deleted, *e.g.*, a soluble NGPCR lacking the TM or both the TM and CD regions, or a truncated, nonfunctional NGPCR lacking all or a portion of the CD region. Nucleotides encoding fusion proteins may include, but are not limited to, full length NGPCR sequences, truncated NGPCRs, or nucleotides encoding peptide fragments of NGPCR fused to an unrelated protein or peptide, such as for example, a transmembrane sequence, which anchors the NGPCR ECD to the cell membrane; an Ig Fc domain which increases the stability and half life of the resulting fusion protein (*e.g.*, NGPCR-Ig) in the bloodstream; or an enzyme, fluorescent protein, luminescent protein which can be used as a marker.

The invention also includes polynucleotides encoding any protein described herein, for example, the proteins shown in SEQ ID NOS:2 and 4. The degenerate nature of the genetic code is well known, and, accordingly, each amino acid presented

in the Sequence Listing, is generically representative of the well known nucleic acid "triplet" codon, or in many cases codons, that can encode the amino acid. As such, as contemplated herein, the amino acid sequences presented in the Sequence Listing, when taken together with the genetic code (see, for example, Table 4-1 at page 109 of "Molecular Cell Biology", 1986, J. Darnell *et al.* eds., Scientific American Books, New York, NY, herein incorporated by reference) are generically representative of the various permutations and combinations of nucleic acid sequences that can encode such amino acid sequences.

The invention also encompasses (a) DNA vectors that contain any of the NGPCR coding sequences and/or their complements (*e.g.*, antisense); (b) DNA expression vectors that contain any of the NGPCR coding sequences operatively associated with a regulatory element that directs the expression of the coding sequences; and (c) genetically engineered host cells that contain any of the NGPCR coding sequences operatively associated with one or more regulatory elements that directs the expression of the coding sequences in the host cell. As used herein, regulatory elements include, but are not limited to, inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators and other elements known to those skilled in the art that drive and/or regulate expression. Such regulatory elements include, but are not limited to, the cytomegalovirus hCMV immediate early gene, regulatable, viral (particularly retroviral LTR) promoters, the early or late promoters of SV40 adenovirus, the lac system, the trp system, the TAC system, the TRC system, the major operator and promoter regions of phage A, the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase (PGK), the promoters of acid phosphatase, and the promoters of the yeast  $\alpha$ -mating factors.

### 5.2 NGPCR Proteins and Polypeptides

NGPCR proteins, polypeptides and peptide fragments, mutated, truncated or deleted forms of the NGPCR and/or NGPCR fusion proteins can be prepared for a variety of uses, including but not limited to, the generation of antibodies, as reagents in diagnostic assays, for the identification of other cellular gene products related to a NGPCR, as reagents in assays for screening for compounds that can be used as

pharmaceutical reagents useful in the therapeutic treatment of mental, biological, or medical disorders and disease.

The Sequence Listing discloses the amino acid sequences (SEQ ID NOS:2 and 4) encoded by specifically described NGPCR genes. The NGPCRs have initiator methionines in DNA sequence contexts consistent with translation initiation sites, followed by hydrophobic signal sequences typical of membrane associated proteins. Alternatively spliced forms of the NGPCRs may exist (which may or may not be tissue specific).

The NGPCR amino acid sequences of the invention include the amino acid sequences specifically described in the Sequence Listing as well as analogues and derivatives thereof. Further, corresponding NGPCR homologues from other species are encompassed by the invention. In fact, any NGPCR protein encoded by the NGPCR nucleotide sequences described in Section 5.1, above, are within the scope of the invention.

The invention also encompasses proteins that are functionally equivalent to the NGPCR encoded by the nucleotide sequences described in Section 5.1, as judged by any of a number of criteria, including, but not limited to, the ability to bind a ligand for NGPCR, the ability to effect an identical or complementary signal transduction pathway, a change in cellular metabolism (e.g., ion flux, tyrosine phosphorylation, etc.) or change in phenotype when the NGPCR equivalent is present in an appropriate cell type (such as the amelioration, prevention or delay of a biochemical, biophysical, or overt phenotype). Such functionally equivalent NGPCR proteins include, but are not limited to, additions or substitutions of amino acid residues within the amino acid sequence encoded by the NGPCR nucleotide sequences described above, in Section 5.1, but which result in a silent change, thus producing a functionally equivalent gene product. Amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. For example, nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, and methionine; polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine; positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine, and

histidine; and negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. A substitutions within such a group, for example, is considered a conservative substitution.

While random mutations can be made to NGPCR DNA (using random mutagenesis techniques well known to those skilled in the art) and the resulting mutant NGPCRs tested for activity, site-directed mutations of the NGPCR coding sequence can be engineered (using site-directed mutagenesis techniques well known to those skilled in the art) to generate mutant NGPCRs with increased function, *e.g.*, higher binding affinity for the target ligand, and/or greater signaling capacity; or decreased function, and/or decreased signal transduction capacity. One starting point for such analysis is by aligning the disclosed human sequences with corresponding gene/protein sequences from, for example, other mammals in order to identify amino acid sequence motifs that are conserved between different species. Non-conservative changes can be engineered at variable positions to alter function, signal transduction capability, or both. Where alteration of function is desired, deletion or non-conservative alterations of the conserved regions (*i.e.*, identical amino acid regions) can be engineered. For example, deletion or non-conservative alterations (substitutions or insertions) of the various conserved transmembrane domains can be engineered.

Other mutations to the NGPCR coding sequence can be made to generate NGPCRs that are better suited for expression, scale up, etc. in the host cells chosen. For example, cysteine residues can be deleted or substituted with another amino acid in order to eliminate disulfide bridges; N-linked glycosylation sites can be altered or eliminated to achieve, for example, expression of a homogeneous product that is more easily recovered and purified from yeast hosts which are known to hyperglycosylate N-linked sites. To this end, a variety of amino acid substitutions at one or both of the first or third amino acid positions of any one or more of the glycosylation recognition sequences which occur in the ECD (N-X-S or N-X-T), and/or an amino acid deletion at the second position of any one or more such recognition sequences in the ECD will prevent glycosylation of the NGPCR at the modified tripeptide sequence. (See, *e.g.*, Miyajima *et al.*, 1986, EMBO J. 5(6):1193-1197).

Peptides corresponding to one or more domains of the NGPCR (*e.g.*, ECD, TM, CD, etc.), truncated or deleted NGPCRs (*e.g.*, NGPCR in which a ECD, TM and/or CD is deleted) as well as fusion proteins in which a full length NGPCR, a NGPCR peptide, or truncated NGPCR is fused to an unrelated protein, are also within the scope of the invention and can be designed on the basis of the presently disclosed NGPCR nucleotide and NGPCR amino acid sequences. Such fusion proteins include but are not limited to IgFc fusions which stabilize the NGPCR protein or peptide and prolong half-life *in vivo*; or fusions to any amino acid sequence that allows the fusion protein to be anchored to the cell membrane, allowing an ECD to be exhibited on the cell surface; or fusions to an enzyme, fluorescent protein, or luminescent protein which provide a marker function.

While the NGPCR polypeptides and peptides can be chemically synthesized (*e.g.*, see Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y.), large polypeptides derived from a NGPCR and full length NGPCRs can be advantageously produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art for expressing nucleic acid containing NGPCR gene sequences and/or coding sequences. Such methods can be used to construct expression vectors containing a NGPCR nucleotide sequences described in Section 5.1 and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. See, for example, the techniques described in Sambrook *et al.*, 1989, *supra*, and Ausubel *et al.*, 1989, *supra*. Alternatively, RNA corresponding to all or a portion of a transcript encoded by a NGPCR nucleotide sequence may be chemically synthesized using, for example, synthesizers. See, for example, the techniques described in "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M.J. ed., IRL Press, Oxford, which is incorporated by reference herein in its entirety.

A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the NGPCR nucleotide sequences of the invention. Where the NGPCR peptide or polypeptide is a soluble derivative (*e.g.*, NGPCR peptides corresponding to an ECD; truncated or deleted NGPCR in which a TM and/or CD are deleted) the peptide or

polypeptide can be recovered from the culture, *i.e.*, from the host cell in cases where the NGPCR peptide or polypeptide is not secreted, and from the culture media in cases where the NGPCR peptide or polypeptide is secreted by the cells. However, such expression systems also encompass engineered host cells that express a NGPCR *in situ*, *i.e.*, anchored in the cell membrane. Purification or enrichment of NGPCR from such expression systems can be accomplished using appropriate detergents and lipid micelles and methods well known to those skilled in the art. However, such engineered host cells themselves may be used in situations where it is important not only to retain the structural and functional characteristics of the NGPCR, but to assess biological activity, *e.g.*, in drug screening assays.

The expression systems that may be used for purposes of the invention include but are not limited to, microorganisms such as bacteria (*e.g.*, *E. coli*, *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA expression vectors containing NGPCR nucleotide sequences; yeast (*e.g.*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing NGPCR nucleotide sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus) containing NGPCR sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (*e.g.*, Ti plasmid) containing NGPCR nucleotide sequences; and mammalian cell systems (*e.g.*, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (*e.g.*, metallothionein promoter) or from mammalian viruses (*e.g.*, the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the NGPCR gene product being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of pharmaceutical compositions of NGPCR protein or for raising antibodies to a NGPCR protein, for example, vectors that direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther

*et al.*, 1983, EMBO J. 2:1791), in which a NGPCR coding sequence may be ligated individually into the vector in frame with the *lacZ* coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The PGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) can be used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. A NGPCR gene coding sequence may be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). Successful insertion of NGPCR gene coding sequence will result in inactivation of the polyhedrin gene and production of non-occluded recombinant virus (*i.e.*, virus lacking the proteinaceous coat coded for by the polyhedrin gene). These recombinant viruses are then used to infect *Spodoptera frugiperda* cells in which the inserted gene is expressed (*e.g.*, see Smith *et al.*, 1983, J. Virol. 46: 584; Smith, U.S. Patent No. 4,215,051).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the NGPCR nucleotide sequence of interest may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, *e.g.*, the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by *in vitro* or *in vivo* recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (*e.g.*, region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing a NGPCR gene product in infected hosts (*see, e.g.*, Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted NGPCR nucleotide sequences. These

signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where an entire NGPCR gene or cDNA, including its own initiation codon and adjacent sequences, is inserted into the appropriate expression vector, no additional translational control signals may be needed. However, in cases where only a portion of a NGPCR coding sequence is inserted, exogenous translational control signals, including, perhaps, the ATG initiation codon, typically will be provided. Furthermore, the initiation codon typically must be in phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (See Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

In addition, a host cell strain may be chosen that modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (*e.g.*, glycosylation) and processing (*e.g.*, cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include, but are not limited to, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, and in particular, choroid plexus and testis cell lines.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression typically is preferred. For example, cell lines which stably express the NGPCR sequences described above may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (*e.g.*, promoter, enhancer sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be

allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines which express the NGPCR gene product. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that affect the endogenous activity of the NGPCR gene product.

A number of selection systems may be used. For example, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, *et al.*, 1977, Cell 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, *et al.*, 1980, Cell 22:817) genes can be employed in tk<sup>r</sup>, hgprt<sup>r</sup> or aprt<sup>r</sup> cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); and hygro, which confers resistance to hygromycin (Santerre, *et al.*, 1984, Gene 30:147).

Also, any fusion protein may be readily purified by utilizing an antibody specific for the fusion protein being expressed. For example, a system described by Janknecht *et al.* allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (Janknecht, *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the gene's open reading frame is translationally fused to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. Extracts from cells infected with recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni<sup>2+</sup>-nitriloacetic acid-agarose columns and histidine-tagged proteins are selectively eluted with imidazole-containing buffers.

NGPCR gene products can also be expressed in transgenic animals. Animals of any species, including, but not limited to, worms, mice, rats, rabbits, guinea pigs, other rodents, pigs, micro-pigs, birds, goats, other farm animals, and non-human primates, *e.g.*, baboons, monkeys, and chimpanzees may be used to generate NGPCR transgenic animals.

Any technique known in the art may be used to introduce a NGPCR transgene into animals to produce the founder lines of transgenic animals. Such techniques include, but are not limited to pronuclear microinjection (Hoppe, P.C. and Wagner, T.E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); retrovirus mediated gene transfer into germ lines (Van der Putten *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson *et al.*, 1989, Cell 56:313-321); electroporation of embryos (Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3:1803-1814); and sperm-mediated gene transfer (Lavitrano *et al.*, 1989, Cell 57:717-723); etc. For a review of such techniques, see Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229, which is incorporated by reference herein in its entirety.

The present invention provides for transgenic animals that carry the NGPCR transgene in all their cells, as well as animals which carry the transgene in some, but not all their cells, *i.e.*, mosaic animals or somatic cell transgenic animals. The transgene may be integrated as a single transgene or in concatamers, *e.g.*, head-to-head tandems or head-to-tail tandems. The transgene may also be selectively introduced into and activated in a particular cell type by following, for example, the teaching of Lasko *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236. The regulatory sequences required for such a cell-type specific activation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

When it is desired that the NGPCR gene transgene be integrated into the chromosomal site of the endogenous NGPCR gene, gene targeting is preferred. Briefly, when such a technique is to be utilized, vectors containing some nucleotide sequences homologous to the endogenous NGPCR gene are designed for the purpose of integrating, via homologous recombination with chromosomal sequences, into and disrupting the function of the nucleotide sequence of the endogenous NGPCR gene (*i.e.*, "knockout" animals).

The transgene may also be selectively introduced into a particular cell type, thus inactivating the endogenous NGPCR gene in only that cell type, by following, for example, the teaching of Gu *et al.*, 1994, Science, 265:103-106. The regulatory sequences required for such a cell-type specific inactivation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

Once transgenic animals have been generated, the expression of the recombinant NGPCR gene may be assayed utilizing standard techniques. Initial screening may be accomplished by Southern blot analysis or PCR techniques to analyze animal tissues to assay whether integration of the transgene has taken place. The level of mRNA expression of the transgene in the tissues of the transgenic animals may also be assessed using techniques which include, but are not limited to, Northern blot analysis of tissue samples obtained from the animal, *in situ* hybridization analysis, and RT-PCR. Samples of NGPCR gene-expressing tissue, may also be evaluated immunocytochemically using antibodies specific for the NGPCR transgene product.

### 5.3 Antibodies to NGPCR Proteins

Antibodies that specifically recognize one or more epitopes of a NGPCR or peptide fragments of a NGPCR are also encompassed by the invention. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mAbs), humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')<sub>2</sub> fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above.

The antibodies of the invention may be used, for example, in the detection of NGPCR in a biological sample and may, therefore, be utilized as part of a diagnostic or prognostic technique whereby patients may be tested for abnormal amounts of NGPCR. Such antibodies may also be utilized in conjunction with, for example, compound screening schemes, as described, below, in Section 5.5, for the evaluation of the effect of test compounds on expression and/or activity of a NGPCR gene product. Additionally, such antibodies can be used in conjunction with gene therapy, for example, to evaluate the normal and/or engineered NGPCR-expressing cells prior to their introduction into the patient. Such antibodies may additionally be used for a

method for the inhibition of abnormal NGPCR activity. Thus, such antibodies may be utilized, for example, as part of weight disorder treatment methods.

For the production of antibodies, various host animals may be immunized by injection with the NGPCR, an NGPCR peptide (*e.g.*, one corresponding to a functional domain of the receptor, such as an ECD, TM or CD), truncated NGPCR polypeptides (NGPCR in which one or more domains, *e.g.*, a TM or CD, has been deleted). Such host animals may include, but are not limited to, rabbits, mice, and rats, to name but a few. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including, but not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of the immunized animals.

Monoclonal antibodies (mAbs), which are homogeneous populations of antibodies to a particular antigen, may be obtained by any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique of Kohler and Milstein, (1975, *Nature* 256:495-497; and U.S. Patent No. 4,376,110), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030), and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAb of this invention may be cultivated in vitro or in vivo. Production of high titers of mAbs in vivo makes this the presently preferred method of production.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature*, 314:452-454) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes

from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human immunoglobulin constant region.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent 4,946,778; Bird, 1988, *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; and Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-546) can be adapted to produce single chain antibodies against NGPCR gene products. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide.

Antibody fragments which recognize specific epitopes may be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed (Huse *et al.*, 1989, *Science*, 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity.

Antibodies to a NGPCR can, in turn, be utilized to generate anti-idiotype antibodies that "mimic" a given NGPCR, using techniques well known to those skilled in the art. (See, e.g., Greenspan & Bona, 1993, *FASEB J* 7(5):437-444; and Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438). For example, antibodies which bind to a NGPCR ECD and competitively inhibit the binding of a ligand of NGPCR can be used to generate anti-idiotypes that "mimic" a NGPCR ECD and, therefore, bind and neutralize a ligand. Such neutralizing anti-idiotypes or Fab fragments of such anti-idiotypes can be used in therapeutic regimens involving the NGPCR signaling pathway.

#### 5.4 Diagnosis of Abnormalities Related to a NGPCR

A variety of methods can be employed for the diagnostic and prognostic evaluation of disorders related to NGPCR function, and for the identification of subjects having a predisposition to such disorders.

Such methods may, for example, utilize reagents such as the NGPCR nucleotide sequences described in Section 5.1, and NGPCR antibodies, as described, in Section 5.3. Specifically, such reagents may be used, for example, for: (1) the detection of the presence of NGPCR gene mutations, or the detection of either over- or under-expression of NGPCR mRNA relative to a given phenotype; (2) the detection of either an over- or an under-abundance of NGPCR gene product relative to a given phenotype; and (3) the detection of perturbations or abnormalities in the signal transduction pathway mediated by NGPCR.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one specific NGPCR nucleotide sequence or NGPCR antibody reagent described herein, which may be conveniently used, *e.g.*, in clinical settings, to diagnose patients exhibiting body weight disorder abnormalities.

For the detection of NGPCR mutations, any nucleated cell can be used as a starting source for genomic nucleic acid. For the detection of NGPCR gene expression or NGPCR gene products, any cell type or tissue in which the NGPCR gene is expressed, such as, for example, brain cells, may be utilized.

Nucleic acid-based detection techniques are described, below, in Section 5.4.1. Peptide detection techniques are described, below, in Section 5.4.2.

#### 5.4.1 Detection of NGPCR Genes and Transcripts

Mutations within a NGPCR gene can be detected by utilizing a number of techniques. Nucleic acid from any nucleated cell can be used as the starting point for such assay techniques, and may be isolated according to standard nucleic acid preparation procedures which are well known to those of skill in the art.

DNA may be used in hybridization or amplification assays of biological samples to detect abnormalities involving NGPCR gene structure, including point mutations, insertions, deletions and chromosomal rearrangements. Such assays may include, but are not limited to, Southern analyses, single stranded conformational polymorphism analyses (SSCP), and PCR analyses.

Such diagnostic methods for the detection of NGPCR gene-specific mutations can involve, for example, contacting and incubating nucleic acids (including

recombinant DNA molecules, cloned genes or degenerate variants thereof) obtained from a sample (*e.g.*, derived from a patient sample or other appropriate cellular source) with one or more labeled nucleic acid reagents (including recombinant DNA molecules, cloned genes or degenerate variants thereof, as described in Section 5.1) under conditions favorable for the specific annealing of these reagents to their complementary sequences within a given NGPCR gene. Preferably, the lengths of these nucleic acid reagents are at least 15 to 30 nucleotides. After incubation, all non-annealed nucleic acids are removed from the nucleic acid:NGPCR molecule hybrid. The presence of nucleic acids which have hybridized, if any such molecules exist, is then detected. Using such a detection scheme, the nucleic acid from the cell type or tissue of interest can be immobilized, for example, to a solid support such as a membrane, or a plastic surface such as that on a microtiter plate or polystyrene beads. In this case, after incubation, non-annealed, labeled nucleic acid reagents of the type described in Section 5.1 are easily removed. Detection of the remaining, annealed, labeled NGPCR nucleic acid reagents is accomplished using standard techniques well-known to those in the art. The NGPCR gene sequences to which the nucleic acid reagents have annealed can be compared to the annealing pattern expected from a normal NGPCR gene sequence in order to determine whether a NGPCR gene mutation is present.

Alternative diagnostic methods for the detection of NGPCR gene specific nucleic acid molecules, in patient samples or other appropriate cell sources, may involve their amplification, *e.g.*, by PCR (the experimental embodiment set forth in Mullis, K.B., 1987, U.S. Patent No. 4,683,202), followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. The resulting amplified sequences can be compared to those which would be expected if the nucleic acid being amplified contained only normal copies of a NGPCR gene in order to determine whether a NGPCR gene mutation exists.

Additionally, well-known genotyping techniques can be performed to identify individuals carrying NGPCR gene mutations. Such techniques include, for example, the use of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), which involve

sequence variations in one of the recognition sites for the specific restriction enzyme used.

Additionally, improved methods for analyzing DNA polymorphisms have been described which capitalize on the presence of variable numbers of short, tandemly repeated DNA sequences between the restriction enzyme sites. For example, Weber (U.S. Pat. No. 5,075,217, which is incorporated herein by reference in its entirety) describes a DNA marker based on length polymorphisms in blocks of (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> short tandem repeats. The average separation of (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> blocks is estimated to be 30,000-60,000 bp. Markers which are so closely spaced exhibit a high frequency co-inheritance, and are extremely useful in the identification of genetic mutations. Thus, such methods can be used to identify, mutations within a given NGPCR gene, and the diagnosis of diseases and disorders related to NGPCR mutations.

Also, Caskey *et al.* (U.S. Pat. No. 5,364,759, which is incorporated herein by reference in its entirety) describe a DNA profiling assay for detecting short tri and tetra nucleotide repeat sequences. The process includes extracting the DNA of interest, amplifying the extracted DNA, and labeling the repeat sequences to form a genotypic map of the individual's DNA. This method can be employed with NGPCR DNA.

The level of NGPCR gene expression can also be assayed by detecting and measuring NGPCR transcription. For example, RNA from a cell type or tissue known, or suspected to express the NGPCR gene, such as brain, may be isolated and tested utilizing hybridization or PCR techniques such as are described above. The isolated cells can be derived from cell culture or from a patient. The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the assessment of cells to be used as part of a cell-based gene therapy technique or, alternatively, to test the effect of compounds on the expression of the NGPCR gene. Such analyses may reveal both quantitative and qualitative aspects of the expression pattern of the NGPCR gene, including activation or inactivation of NGPCR gene expression.

In one embodiment of such a detection scheme, cDNAs are synthesized from the RNAs of interest (*e.g.*, by reverse transcription of the RNA molecule into cDNA).

A sequence within the cDNA is then used as the template for a nucleic acid amplification reaction, such as a PCR amplification reaction, or the like. The nucleic acid reagents used as synthesis initiation reagents (*e.g.*, primers) in the reverse transcription and nucleic acid amplification steps of this method are chosen from among the NGPCR nucleic acid reagents described in Section 5.1. The preferred lengths of such nucleic acid reagents are at least 9-30 nucleotides. For detection of the amplified product, the nucleic acid amplification may be performed using radioactively or non-radioactively labeled nucleotides. Alternatively, enough amplified product may be made such that the product may be visualized by standard ethidium bromide staining, by utilizing any other suitable nucleic acid staining method, or by sequencing.

Additionally, it is possible to perform such NGPCR gene expression assays "in situ", *i.e.*, directly upon tissue sections (fixed and/or frozen) of patient tissue obtained from biopsies or resections, such that no nucleic acid purification is necessary. Nucleic acid reagents such as those described in Section 5.1 may be used as probes and/or primers for such *in situ* procedures (See, for example, Nuovo, G.J., 1992, "PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications", Raven Press, NY).

Alternatively, if a sufficient quantity of the appropriate cells can be obtained, standard Northern analysis can be performed to determine the level of mRNA expression of the NGPCR gene.

#### 5.4.2 Detection of NGPCR Gene Products

Antibodies directed against wild type or mutant NGPCR gene products or homologues or functionally equivalent proteins or peptide fragments thereof, which are discussed above in Section 5.3, may also be used as diagnostics and prognostics, as described herein. Such diagnostic methods, may be used to detect abnormalities in the level of NGPCR gene expression, or abnormalities in the structure and/or temporal, tissue, cellular, or subcellular location of the NGPCR, and may be performed *in vivo* or *in vitro*, such as, for example, on biopsy tissue.

For example, antibodies directed to epitopes of the NGPCR ECD can be used *in vivo* to detect the pattern and level of expression of the NGPCR in the body. Such antibodies can be labeled, *e.g.*, with a radio-opaque or other appropriate compound

and injected into a subject in order to visualize binding to the NGPCR expressed in the body using methods such as X-rays, CAT-scans, or MRI. Labeled antibody fragments, *e.g.*, the Fab or single chain antibody comprising the smallest portion of the antigen binding region, are preferred for this purpose to promote crossing the blood-brain barrier and permit labeling NGPCRs expressed in the brain.

Additionally, any NGPCR fusion protein or NGPCR conjugated protein whose presence can be detected, can be administered. For example, NGPCR fusion or conjugated proteins labeled with a radio-opaque or other appropriate compound can be administered and visualized *in vivo*, as discussed, above for labeled antibodies. Further, such NGPCR fusion proteins as AP-NGPCR or NGPCR-Ap fusion proteins can be utilized for *in vitro* diagnostic procedures.

Alternatively, immunoassays or fusion protein detection assays, as described above, can be utilized on biopsy and autopsy samples *in vitro* to permit assessment of the expression pattern of the NGPCR. Such assays are not confined to the use of antibodies that define a NGPCR ECD, but can include the use of antibodies directed to epitopes of any of the domains of a NGPCR, *e.g.*, the ECD, the TM and/or CD. The use of each or all of these labeled antibodies will yield useful information regarding translation and intracellular transport of the NGPCR to the cell surface, and can identify defects in processing.

The tissue or cell type to be analyzed will generally include those which are known, or suspected, to express the NGPCR gene, such as, for example, brain cells. The protein isolation methods employed herein may, for example, be such as those described in Harlow and Lane (Harlow, E. and Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), which is incorporated herein by reference in its entirety. The isolated cells can be derived from cell culture or from a patient. The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the assessment of cells that could be used as part of a cell-based gene therapy technique or, alternatively, to test the effect of compounds on the expression of a NGPCR gene.

For example, antibodies, or fragments of antibodies, such as those described above in Section 5.3, may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence

of NGPCR gene products or peptide fragments thereof. This can be accomplished, for example, by immunofluorescence techniques employing a fluorescently labeled antibody (see, this Section below) coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorimetric detection. Such techniques are especially preferred if such NGPCR gene products are expressed on the cell surface.

The antibodies (or fragments thereof) or NGPCR fusion or conjugated proteins useful in the present invention may, additionally, be employed histologically. For example, one may use them in immunofluorescence, immunoelectron microscopy or non-immuno assays for *in situ* detection of NGPCR gene products or peptide fragments. One may also use them, for example, for NGPCR binding (in the case of labeled NGPCR ligand fusion protein). *In situ* detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient and applying a labeled antibody or fusion protein of the present invention to it. The antibody (or fragment) or fusion protein is preferably applied by overlaying the labeled antibody (or fragment) onto a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of the NGPCR gene product, or peptide fragments, or NGPCR binding (for example, to a ligand), but also its distribution in the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily perceive that any of a wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to achieve such *in situ* detection.

Immunoassays and non-immunoassays for NGPCR gene products or peptide fragments thereof will typically comprise: incubating a sample, such as a biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells, or lysates of cells which have been incubated in cell culture, in the presence of a detectably labeled antibody capable of identifying NGPCR gene products or peptide fragments thereof; and detecting the bound antibody by any of a number of techniques well-known in the art.

The biological sample may be brought in contact with and immobilized onto a solid phase support or carrier such as nitrocellulose or other solid support, which is capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support may then be washed with suitable buffers, followed by treatment with the detectably labeled NGPCR antibody or NGPCR ligand fusion protein. The solid phase support may then

be washed with the buffer a second time to remove unbound antibody or fusion protein. The amount of bound label on solid support may then be detected by conventional means.

The term "solid phase support or carrier" is intended to include any support capable of binding an antigen or an antibody. Well-known supports or carriers include, but are not limited to, glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amyloses, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports include polystyrene beads. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

The binding activity of a given lot of NGPCR antibody or NGPCR ligand fusion protein may be determined according to well known methods. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation.

With respect to antibodies, one of the ways in which the NGPCR antibody can be detectably labeled is by linking the antibody to an enzyme and using the antibody in an enzyme immunoassay (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller, A. *et al.*, 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, J.E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kgaku Shoin, Tokyo). The enzyme that is bound to the antibody will react with an appropriate substrate, preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorimetric or by visual means. Enzymes which can be used

to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate, dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Detection may also be accomplished using any of a variety of other immunoassays. For example, by radioactively labeling the antibodies or antibody fragments, it is possible to detect NGPCR through the use of a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, which is incorporated by reference herein). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography.

It is also possible to label the antibody with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled antibody is exposed to light of the proper wave length, its presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin,  $\alpha$ -phthaldehyde and fluorescamine.

The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as  $^{152}\text{Eu}$ , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

The antibody also can be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent

labeling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling include, but are not limited to, luciferin, luciferase and aequorin.

#### 5.5 Screening Assays for Compounds That Modulate NGPCR Expression or Activity

The following assays are designed to identify compounds that interact with (e.g., bind to) NGPCRs (including, but not limited to, an ECD or CD of a NGPCR), compounds that interact with (e.g., bind to) intracellular proteins that interact with NGPCR (including but not limited to, the TM and CD of a NGPCR), compounds that interfere with the interaction of NGPCR with transmembrane or intracellular proteins involved in NGPCR-mediated signal transduction, and to compounds which modulate the activity of NGPCR gene (*i.e.*, modulate the level of NGPCR gene expression) or modulate the level of NGPCR. Assays may additionally be utilized which identify compounds which bind to NGPCR gene regulatory sequences (e.g., promoter sequences) and which may modulate NGPCR gene expression. See *e.g.*, Platt, K.A., 1994, J. Biol. Chem. 269:28558-28562, which is incorporated herein by reference in its entirety.

The compounds which may be screened in accordance with the invention include but are not limited to peptides, antibodies and fragments thereof, and other organic compounds (e.g., peptidomimetics) that bind to an ECD of a NGPCR and either mimic the activity triggered by the natural ligand (*i.e.*, agonists) or inhibit the activity triggered by the natural ligand (*i.e.*, antagonists); as well as peptides, antibodies or fragments thereof, and other organic compounds that mimic the ECD of the NGPCR (or a portion thereof) and bind to and "neutralize" natural ligand.

Such compounds may include, but are not limited to, peptides such as, for example, soluble peptides, including but not limited to members of random peptide

libraries; (see, e.g., Lam, K.S. *et al.*, 1991, *Nature* 354:82-84; Houghten, R. *et al.*, 1991, *Nature* 354:84-86), and combinatorial chemistry-derived molecular library made of D- and/or L- configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide libraries; see, e.g., Songyang, Z. *et al.*, 1993, *Cell* 72:767-778), antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and FAb, F(ab')<sub>2</sub> and FAb expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof), and small organic or inorganic molecules.

Other compounds which can be screened in accordance with the invention include but are not limited to small organic molecules that are able to cross the blood-brain barrier, gain entry into an appropriate cell (e.g., in the choroid plexus, the hypothalamus, etc.) and affect the expression of a NGPCR gene or some other gene involved in the NGPCR signal transduction pathway (e.g., by interacting with the regulatory region or transcription factors involved in gene expression); or such compounds that affect the activity of the NGPCR (e.g., by inhibiting or enhancing the enzymatic activity of a CD) or the activity of some other intracellular factor involved in the NGPCR signal transduction pathway.

Computer modeling and searching technologies permit identification of compounds, or the improvement of already identified compounds, that can modulate NGPCR expression or activity. Having identified such a compound or composition, the active sites or regions are identified. Such active sites might typically be ligand binding sites. The active site can be identified using methods known in the art including, for example, from the amino acid sequences of peptides, from the nucleotide sequences of nucleic acids, or from study of complexes of the relevant compound or composition with its natural ligand. In the latter case, chemical or X-ray crystallographic methods can be used to find the active site by finding where on the factor the complexed ligand is found.

Next, the three dimensional geometric structure of the active site is determined. This can be done by known methods, including X-ray crystallography, which can determine a complete molecular structure. Also, solid or liquid phase NMR can be used to determine certain intra-molecular distances. Any other

experimental method of structure determination can be used to obtain partial or complete geometric structures. The geometric structures may be measured with a complexed ligand, natural or artificial, which may increase the accuracy of the active site structure determined.

If an incomplete or insufficiently accurate structure is determined, the methods of computer based numerical modeling can be used to complete the structure or improve its accuracy. Any recognized modeling method may be used, including parameterized models specific to particular biopolymers such as proteins or nucleic acids, molecular dynamics models based on computing molecular motions, statistical mechanics models based on thermal ensembles, or combined models. For most types of models, standard molecular force fields, representing the forces between constituent atoms and groups, are necessary, and can be selected from force fields known in physical chemistry. The incomplete or less accurate experimental structures can serve as constraints on the complete and more accurate structures computed by these modeling methods.

Finally, having determined the structure of the active site, typically either experimentally, by modeling, or by a combination, candidate modulating compounds can be identified by searching databases containing compounds along with information on their molecular structure. Such a search seeks compounds having structures that match the determined active site structure and that interact with the groups defining the active site. Such a search can be manual, but is preferably computer assisted. These compounds found from this search are potential NGPCR modulating compounds (*i.e.*, compounds of modulating an activity of a NGPCR).

Alternatively, these methods can be used to identify improved modulating compounds from an already known modulating compound or ligand. The composition of the known compound can be modified and the structural effects of modification can be determined using the experimental and computer modeling methods described above applied to the new composition. The altered structure is then compared to the active site structure of the compound to determine if an improved fit or interaction results. In this manner, systematic variations in

composition, such as by varying side groups, can be quickly evaluated to obtain modified modulating compounds or ligands of improved specificity or activity.

Further experimental and computer modeling methods useful to identify modulating compounds based upon identification of the active sites of a NGPCR, and related transduction and transcription factors will be apparent to those of skill in the art.

Examples of molecular modeling systems are the CHARMM and QUANTA programs (Polygen Corporation, Waltham, MA). CHARMM performs the energy minimization and molecular dynamics functions. QUANTA performs the construction, graphic modeling and analysis of molecular structure. QUANTA allows interactive construction, modification, visualization, and analysis of the behavior of molecules with each other.

A number of articles review computer modeling of drugs interactive with specific proteins, such as Rotivinen, *et al.*, 1988, Acta Pharmaceutical Fennica 97:159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (June 16, 1988); McKinlay and Rossmann, 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:111-122; Perry and Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis and Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236:125-140 and 141-162; and, with respect to a model receptor for nucleic acid components, Askew, *et al.*, 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:1082-1090. Other computer programs that screen and graphically depict chemicals are available from companies such as BioDesign, Inc. (Pasadena, CA.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada), and Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario). Although these are primarily designed for application to drugs specific to particular proteins, they can be adapted to design drugs specific to regions of DNA or RNA, once that region is identified.

Although described above with reference to design and generation of compounds which could alter binding, one could also screen libraries of known compounds, including natural products or synthetic chemicals, and biologically active materials, including proteins, for compounds which are inhibitors or activators.

Cell-based systems can also be used to identify compounds that bind NGPCRs as well as assess the altered activity associated with such binding in living cells. One

tool of particular interest for such assays is green fluorescent protein which is described, *inter alia*, in U.S. Patent No. 5,625,048, herein incorporated by reference. Cells that may be used in such cellular assays include, but are not limited to, leukocytes, or cell lines derived from leukocytes, lymphocytes, stem cells, including embryonic stem cells, and the like. In addition, expression host cells (*e.g.*, B95 cells, COS cells, CHO cells, OMK cells, fibroblasts, Sf9 cells) genetically engineered to express a functional NGPCR of interest and to respond to activation by the test, or natural, ligand, as measured by a chemical or phenotypic change, or induction of another host cell gene, can be used as an end point in the assay.

Compounds identified via assays such as those described herein may be useful, for example, in elaborating the biological function of a NGPCR gene product. Such compounds can be administered to a patient at therapeutically effective doses to treat any of a variety of physiological or mental disorders. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in any amelioration, impediment, prevention, or alteration of any biological or overt symptom.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD<sub>50</sub> (the dose lethal to 50% of the population) and the ED<sub>50</sub> (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Compounds which exhibit large therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects may be used, often care should be taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED<sub>50</sub> with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be

estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC<sub>50</sub> (*i.e.*, the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention may be formulated in conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers or excipients. Thus, the compounds and their physiologically acceptable salts and solvates may be formulated for administration by inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral, intracranial, intrathecal, or rectal administration.

For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (*e.g.*, pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (*e.g.*, lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (*e.g.*, magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (*e.g.*, potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (*e.g.*, sodium lauryl sulphate). The tablets may be coated by methods well known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (*e.g.*, sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (*e.g.*, lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (*e.g.*, almond oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (*e.g.*, methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate.

Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled or sustained release of the active compound.

For buccal administration the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, *e.g.*, dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, *e.g.*, gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, *e.g.*, by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, *e.g.*, in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, *e.g.*, sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, *e.g.*, containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient.

The pack may, for example, comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

#### 5.5.1 In Vitro Screening Assays for Compounds That Bind to NGPCRs

*In vitro* systems may be designed to identify compounds capable of interacting with (e.g., binding to) NGPCR (including, but not limited to, a ECD or CD of NGPCR). Compounds identified may be useful, for example, in modulating the activity of wild type and/or mutant NGPCR gene products; may be useful in elaborating the biological function of the NGPCR; may be utilized in screens for identifying compounds that disrupt normal NGPCR interactions; or may in themselves disrupt such interactions.

In certain embodiments, a principle of the assays used to identify compounds that bind to the NGPCR involves preparing a reaction mixture of the NGPCR and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact and bind, thus forming a complex which can be removed and/or detected in the reaction mixture. The NGPCR species used can vary depending upon the goal of the screening assay. For example, where agonists of the natural ligand are sought, the full length NGPCR, or a soluble truncated NGPCR, e.g., in which the TM and/or CD is deleted from the molecule, a peptide corresponding to a ECD or a fusion protein containing one or more NGPCR ECD fused to a protein or polypeptide that affords advantages in the assay system (e.g., labeling, isolation of the resulting complex, etc.) can be utilized. Where compounds that interact with the cytoplasmic domain are sought to be identified, peptides corresponding to the NGPCR CD and fusion proteins containing the NGPCR CD can be used.

The screening assays can be conducted in a variety of ways. For example, one method to conduct such an assay would involve anchoring the NGPCR protein, polypeptide, peptide or fusion protein or the test substance onto a solid phase and detecting NGPCR/test compound complexes anchored on the solid phase at the end of the reaction. In certain embodiments of such a method, the NGPCR reactant may be anchored onto a solid surface, and the test compound, which is not anchored, may be labeled, either directly or indirectly.

In practice, microtiter plates may conveniently be utilized as the solid phase.

The anchored component may be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Non-covalent attachment may be accomplished by simply coating the solid surface with a solution of the protein and drying. Alternatively, an immobilized antibody, preferably a monoclonal antibody, specific for the protein to be immobilized may be used to anchor the protein to the solid surface. The surfaces may be prepared in advance and stored.

In order to conduct the assay, the nonimmobilized component is added to the coated surface containing the anchored component. After the reaction is complete, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously nonimmobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the previously nonimmobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific for the previously nonimmobilized component (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody).

In certain embodiments, a reaction can be conducted in a liquid phase, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; *e.g.*, using an immobilized antibody specific for a NGPCR protein, polypeptide, peptide or fusion protein or the test compound to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other component of the possible complex to detect anchored complexes.

In certain embodiments, cell-based assays can be used to identify compounds that interact with NGPCR. To this end, cell lines that express NGPCR, or cell lines (*e.g.*, COS cells, CHO cells, fibroblasts, etc.) that have been genetically engineered to express NGPCR (*e.g.*, by transfection or transduction of NGPCR DNA) can be used. Interaction of the test compound with, for example, a ECD of a NGPCR expressed by the host cell can be determined by comparison or competition with native ligand.

### 5.5.2 Assays for Intracellular Proteins That Interact with NGPCRs

Any method suitable for detecting protein-protein interactions may be employed for identifying transmembrane proteins or intracellular proteins that interact with a NGPCR. Among the traditional methods which may be employed are co-immunoprecipitation, crosslinking and co-purification through gradients or chromatographic columns of cell lysates or proteins obtained from cell lysates and a NGPCR to identify proteins in the lysate that interact with the NGPCR. For these assays, the NGPCR component used can be a full length NGPCR, a soluble derivative lacking the membrane-anchoring region (*e.g.*, a truncated NGPCR in which a TM is deleted resulting in a truncated molecule containing a ECD fused to a CD), a peptide corresponding to a CD or a fusion protein containing a CD of a NGPCR. Once isolated, such an intracellular protein can be identified and can, in turn, be used, in conjunction with standard techniques, to identify proteins with which it interacts. For example, at least a portion of the amino acid sequence of an intracellular protein which interacts with a NGPCR can be ascertained using techniques well known to those of skill in the art, such as via the Edman degradation technique. (See, *e.g.*, Creighton, 1983, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W.H. Freeman & Co., N.Y., pp.34-49). The amino acid sequence obtained may be used as a guide for the generation of oligonucleotide mixtures that can be used to screen for gene sequences encoding such intracellular proteins. Screening may be accomplished, for example, by standard hybridization or PCR techniques. Techniques for the generation of oligonucleotide mixtures and the screening are well-known. (See, *e.g.*, Ausubel, *supra*, and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Innis, M. *et al.*, eds. Academic Press, Inc., New York).

Additionally, methods may be employed which result in the simultaneous identification of genes which encode the transmembrane or intracellular proteins interacting with NGPCR. These methods include, for example, probing expression libraries, in a manner similar to the well known technique of antibody probing of λgt11 libraries, using labeled NGPCR protein, or an NGPCR polypeptide, peptide or fusion protein, *e.g.*, an NGPCR polypeptide or NGPCR domain fused to a marker (*e.g.*, an enzyme, fluor, luminescent protein, or dye), or an Ig-Fc domain.

One method which detects protein interactions *in vivo*, the two-hybrid system, is described in detail for illustration only and not by way of limitation. One version of this system has been described (Chien *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582) and is commercially available from Clontech (Palo Alto, CA).

Briefly, utilizing such a system, plasmids are constructed that encode two hybrid proteins: one plasmid contains of nucleotides encoding the DNA-binding domain of a transcription activator protein fused to a NGPCR nucleotide sequence encoding NGPCR, an NGPCR polypeptide, peptide or fusion protein, and the other plasmid contains of nucleotides encoding the transcription activator protein's activation domain fused to a cDNA encoding an unknown protein which has been recombined into this plasmid as part of a cDNA library. The DNA-binding domain fusion plasmid and the cDNA library are transformed into a strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that contains a reporter gene (*e.g.*, HBS or *lacZ*) whose regulatory region contains the transcription activator's binding site. Either hybrid protein alone cannot activate transcription of the reporter gene: the DNA-binding domain hybrid cannot because it does not provide activation function and the activation domain hybrid cannot because it cannot localize to the activator's binding sites. Interaction of the two hybrid proteins reconstitutes the functional activator protein and results in expression of the reporter gene, which is detected by an assay for the reporter gene product.

The two-hybrid system or related methodology may be used to screen activation domain libraries for proteins that interact with the "bait" gene product. By way of example, and not by way of limitation, a NGPCR may be used as the bait gene product. Total genomic or cDNA sequences are fused to the DNA encoding an activation domain. This library and a plasmid encoding a hybrid of a bait NGPCR gene product fused to the DNA-binding domain are cotransformed into a yeast reporter strain, and the resulting transformants are screened for those that express the reporter gene. For example, and not by way of limitation, a bait NGPCR gene sequence, such as the open reading frame of a NGPCR (or a domain of a NGPCR) can be cloned into a vector such that it is translationally fused to the DNA encoding the DNA-binding domain of the GAL4 protein. These colonies are purified and the

library plasmids responsible for reporter gene expression are isolated. DNA sequencing is then used to identify the proteins encoded by the library plasmids.

A cDNA library of the cell line from which proteins that interact with bait NGPCR gene product are to be detected can be made using methods routinely practiced in the art. According to the particular system described herein, for example, the cDNA fragments can be inserted into a vector such that they are translationally fused to the transcriptional activation domain of GAL4. This library can be co-transformed along with the bait NGPCR gene-GAL4 fusion plasmid into a yeast strain which contains a lacZ gene driven by a promoter which contains GAL4 activation sequence. A cDNA encoded protein, fused to GAL4 transcriptional activation domain, that interacts with bait NGPCR gene product will reconstitute an active GAL4 protein and thereby drive expression of the HIS3 gene. Colonies which express HIS3 can be detected by their growth on petri dishes containing semi-solid agar based media lacking histidine. The cDNA can then be purified from these strains, and used to produce and isolate the bait NGPCR gene-interacting protein using techniques routinely practiced in the art.

#### 5.5.3 Assays for Compounds That Interfere with NGPCR/intracellular or NGPCR/Transmembrane Macromolecule Interaction

The macromolecules that interact with the NGPCR are referred to, for purposes of this discussion, as "binding partners". These binding partners are likely to be involved in the NGPCR signal transduction pathway. Therefore, it is desirable to identify compounds that interfere with or disrupt the interaction of such binding partners, which may be useful in regulating the activity of a NGPCR and controlling disorders associated with NGPCR activity.

In certain embodiments, a basic principle of the assay systems used to identify compounds that interfere with the interaction between a NGPCR and its binding partner or partners involves preparing a reaction mixture containing NGPCR protein, polypeptide, peptide or fusion protein as described in Sections 5.5.1 and 5.5.2 above, and the binding partner under conditions and for a time sufficient to allow the two to interact and bind, thus forming a complex. In order to test a compound for inhibitory activity, the reaction mixture is prepared in the presence and absence of the test

compound. The test compound may be initially included in the reaction mixture, or may be added at a time subsequent to the addition of the NGPCR moiety and its binding partner. Control reaction mixtures are incubated without the test compound or with a placebo. The formation of any complexes between the NGPCR moiety and the binding partner is then detected. The formation of a complex in the control reaction, but not in the reaction mixture containing the test compound, indicates that the compound interferes with the interaction of the NGPCR and the interactive binding partner. Additionally, complex formation within reaction mixtures containing the test compound and normal NGPCR protein may also be compared to complex formation within reaction mixtures containing the test compound and a mutant NGPCR. This comparison may be important in those cases wherein it is desirable to identify compounds that specifically disrupt interactions of mutant, or mutated, NGPCRs but not normal NGPCRs.

Assays for compounds that interfere with the interaction of the NGPCR and binding partners can be conducted in a heterogeneous or homogeneous format. Heterogeneous assays involve anchoring either the NGPCR moiety product or the binding partner onto a solid phase and detecting complexes anchored on the solid phase at the end of the reaction. In homogeneous assays, the entire reaction is carried out in a liquid phase. In either approach, the order of addition of reactants can be varied to obtain different information about the compounds being tested. For example, test compounds that interfere with the interaction by competition can be identified by conducting the reaction in the presence of the test substance; *i.e.*, by adding the test substance to the reaction mixture prior to, or simultaneously with, a NGPCR moiety and interactive binding partner. Alternatively, test compounds that disrupt preformed complexes, *e.g.* compounds with higher binding constants that displace one of the components from the complex, can be tested by adding the test compound to the reaction mixture after complexes have been formed. The various formats are described briefly below.

In certain heterogeneous assay systems, either a NGPCR moiety or an interactive binding partner, is anchored onto a solid surface, while the non-anchored species is labeled, either directly or indirectly. In practice, microtiter plates are

conveniently utilized. The anchored species may be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Non-covalent attachment may be accomplished simply by coating the solid surface with a solution of the NGPCR gene product or binding partner and drying. Alternatively, an immobilized antibody specific for the species to be anchored may be used to anchor the species to the solid surface. The surfaces may be prepared in advance and stored.

In order to conduct the assay, the partner of the immobilized species is exposed to the coated surface with or without the test compound. After the reaction is complete, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) and any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the non-immobilized species is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the non-immobilized species is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific for the initially non-immobilized species (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody). Depending upon the order of addition of reaction components, test compounds which inhibit complex formation or which disrupt preformed complexes can be detected.

Alternatively, the reaction can be conducted in a liquid phase in the presence or absence of the test compound, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; *e.g.*, using an immobilized antibody specific for one of the binding components to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other partner to detect anchored complexes. Again, depending upon the order of addition of reactants to the liquid phase, test compounds which inhibit complex or which disrupt preformed complexes can be identified.

In other embodiments of the invention, a homogeneous assay can be used. In this approach, a preformed complex of a NGPCR moiety and an interactive binding partner is prepared in which either the NGPCR or its binding partners is labeled, but the signal generated by the label is quenched due to formation of the complex (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,109,496 by Rubenstein which utilizes this approach for

immunoassays). The addition of a test substance that competes with and displaces one of the species from the preformed complex will result in the generation of a signal above background. In this way, test substances which disrupt NGPCR/intracellular binding partner interaction can be identified.

In particular embodiments, a NGPCR fusion can be prepared for immobilization. For example, a NGPCR or a peptide fragment, *e.g.*, corresponding to a CD, can be fused to a glutathione-S-transferase (GST) gene using a fusion vector, such as pGEX-5X-1, in such a manner that its binding activity is maintained in the resulting fusion protein. The interactive binding partner can be purified and used to raise a monoclonal antibody, using methods routinely practiced in the art, *e.g.*, as described above in Section 5.3. This antibody can be labeled with the radioactive isotope  $^{125}\text{I}$ , for example, by methods routinely practiced in the art. In a heterogeneous assay, *e.g.*, the GST-NGPCR fusion protein can be anchored to glutathione-agarose beads. The interactive binding partner can then be added in the presence or absence of the test compound in a manner that allows interaction and binding to occur. At the end of the reaction period, unbound material can be washed away, and the labeled monoclonal antibody can be added to the system and allowed to bind to the complexed components. The interaction between a NGPCR gene product and the interactive binding partner can be detected by measuring the amount of radioactivity that remains associated with the glutathione-agarose beads. A successful inhibition of the interaction by the test compound will result in a decrease in measured radioactivity.

Alternatively, the GST-NGPCR fusion protein and the interactive binding partner can be mixed together in liquid in the absence of the solid glutathione-agarose beads. The test compound can be added either during or after the species are allowed to interact. This mixture can then be added to the glutathione-agarose beads and unbound material is washed away. Again the extent of inhibition of the NGPCR/binding partner interaction can be detected by adding the labeled antibody and measuring the radioactivity associated with the beads.

In certain embodiments of the invention, these same techniques can be employed using peptide fragments that correspond to the binding domains of a

NGPCR and/or the interactive or binding partner (in cases where the binding partner is a protein), in place of one or both of the full length proteins. Any number of methods routinely practiced in the art can be used to identify and isolate the binding sites. These methods include, but are not limited to, mutagenesis of the gene encoding one of the proteins and screening for disruption of binding in a co-immunoprecipitation assay. Compensatory mutations in the gene encoding the second species in the complex can then be selected. Sequence analysis of the genes encoding the respective proteins will reveal the mutations that correspond to the region of the protein involved in interactive binding. Alternatively, one protein can be anchored to a solid surface using methods described above, and allowed to interact with and bind to its labeled binding partner, which has been treated with a proteolytic enzyme, such as trypsin. After washing, a relatively short, labeled peptide comprising the binding domain may remain associated with the solid material, which can be isolated and identified by amino acid sequencing. Also, once the gene coding for the intracellular binding partner is obtained, short gene segments can be engineered to express peptide fragments of the protein, which can then be tested for binding activity and purified or synthesized.

For example, and not by way of limitation, a NGPCR gene product can be anchored to a solid material as described, above, by making a GST-NGPCR fusion protein and allowing it to bind to glutathione agarose beads. The interactive binding partner can be labeled with a radioactive isotope, such as  $^{35}\text{S}$ , and cleaved with a proteolytic enzyme such as trypsin. Cleavage products can then be added to the anchored GST-NGPCR fusion protein and allowed to bind. After washing away unbound peptides, labeled bound material, representing the intracellular binding partner binding domain, can be eluted, purified, and analyzed for amino acid sequence by well-known methods. Peptides so identified can be produced synthetically or fused to appropriate facilitative proteins using recombinant DNA technology.

The present invention is not to be limited in scope by the exemplified embodiments which are intended as illustrations of single aspects of the invention, and any clones, DNA or amino acid sequences which are functionally equivalent are within the scope of the invention. Indeed, various modifications of the invention in

addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims. It is also to be understood that all base pair sizes given for nucleotides are approximate and are used solely for purposes of description.

All documents cited herein are incorporated by reference in their entirety for any purpose. The citation of any of the documents mentioned herein does not constitute an admission that the reference is prior art to the present invention.

Claims

1. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:

- (a) a polynucleotide comprising SEQ ID NO:1;
- (b) a polynucleotide comprising SEQ ID NO:3;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide of SEQ ID NO:2;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4;
- (e) a polynucleotide comprising a first polynucleotide capable of hybridizing to a second polynucleotide under highly stringent conditions, wherein said first polynucleotide encodes a naturally occurring polypeptide and wherein said second polynucleotide is complementary to SEQ ID NO:1;
- (f) a polynucleotide comprising a first polynucleotide capable of hybridizing to a second polynucleotide under highly stringent conditions, wherein said first polynucleotide encodes a naturally occurring polypeptide and wherein said second polynucleotide is complementary to SEQ ID NO:3; and
- (g) a polynucleotide comprising a first polynucleotide capable of hybridizing to a second polynucleotide under highly stringent conditions, wherein said first polynucleotide encodes a naturally occurring polypeptide and wherein said second polynucleotide is complementary to nucleotides 1 through 23 of SEQ ID NO:3.

2. An isolated oligonucleotide comprising from about 16 to about 100 bases of a polynucleotide of Claim 1.

3. An isolated polypeptide selected from the group consisting of:

- (a) a polypeptide comprising SEQ ID NO:2;
- (b) a polypeptide comprising SEQ ID NO:4; and
- (c) a polypeptide encoded by a polynucleotide of Claim 1.

4. An antibody specific to a polypeptide of Claim 3.

5. A cell engineered to contain a polynucleotide of Claim 1.

6. A transgenic mouse engineered to contain a polynucleotide of Claim 1.

## SEQUENCE LISTING

<110> Nehls, Michael

Wattler, Frank

<120> Novel Human Seven-Transmembrane Receptors

<130> 7705-008-00-304

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 969

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

atggattcaa ccatcccagt cttgggtaca gaactgacac caatcaacgg acgtgaggag

60

actccttgct acaaggcagac cctgagcttc acggggctga cgtgcacatcg ttcccttgc

120

gcgctgacag gaaacgcgggt tgtgctctgg ctccctggct gccgcacatgcg caggaacgct

180

gtctccatct acatcctcaa cctggtcgacg gccgacttcc tcttccttag cggccacatt

240

atacgttcgc cgttacgcct catcaatatac cgccatccca tctccaaaat cctcagtcct

300

gtgatgacct ttccctactt tataggcccta agcatgctga gcgcacatcg caccgagcgc

360

tgcctgtcca tcctgtggcc catctggtag cactgccggc gccccagata cctgtcatcg

420

gtcatgtgtg tcctgctctg ggccctgtcc ctgctgcggg gtatcctggg gtggatgttc

480

tgtgacttcc tgtttagtgg tgctgattct gtttgtgtg aaacgtcaga tttcattaca

540

atcgcggtggc tggttttttt atgtgtggtt ctctgtgggt ccagcctgggt cctgctggcc

600

aggattctct gtggatcccg gaagatgccg ctgaccaggc tgtacgtgac catcctcc

660

acagtgtgg tcttcctct ctgtggcctg cccttggca ttcagtggc cctgtttcc

720

aggatccacc tggattggaa agtcttattt tgtcatgtgc atctagtttc cattttcctg

780

tccgctctta acagcagtgc caacccatc atttacttct tcgtgggctc ctttaggcag

840

cgtcaaaata ggcagaacct gaagctggtt ctccagaggg ctctgcagga cacgcctgag

900

gtggatgaag gtggagggca gcttcctcag gaaaccctgg agctgtcggg aagcagattg

960

gagcagtga

969

<210> 2

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 2

Met Asp Ser Thr Ile Pro Val Leu Gly Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn

1 5 10 15

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Gly

20 25 30

Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Ala Leu Thr Gly Asn Ala Val Val

35 40 45

Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr

50 55 60

Ile Leu Asn Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly His Ile

65 70 75 80

Ile Arg Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Arg His Pro Ile Ser Lys

85 90 95

Ile Leu Ser Pro Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Met

100 105 110

Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Ile Leu Trp Pro Ile

115 120 125

Trp Tyr His Cys Arg Arg Pro Arg Tyr Leu Ser Ser Val Met Cys Val

130 135 140

Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Phe

145 150 155 160

Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Val Trp Cys Glu Thr Ser

165 170 175

Asp Phe Ile Thr Ile Ala Trp Leu Val Phe Leu Cys Val Val Leu Cys

180 185 190

Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys

195 200 205

Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val

210 215 220

Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser

225 230 235 240

Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val

245 250 255

Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr

260 265 270

Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys

275 280 285

Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly

290 295 300

Gly Gly Gln Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu

305 310 315 320

Glu Gln

<210> 3

<211> 1659

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggtcacca agcctggaaa catagtcgtc cagcatgctc tgcccacccc acgccgaggt

60

gcactgacca tgagcctcaa ctccctccctc agctgcagga aggagctgag taatctcact

120

gaggaggagg gtggcgaagg gggcggtcatc atcacccagt tcatcgccat cattgtcatc

180

accattttg tctgcctggg aaacctggtc atcgtggta ctttgtacaa gaagtcctac

240

ctccctcaccc tcagcaacaa gttcgcttc agcctgactc tgtccaactt cctgctgtcc

300

gtgttggtgc tgcctttgt ggtgacgagc tccatccgca ggaaatggat ctttggtgta

360

gtgtggtgca acttctctgc ctcctctac ctgctgatca gctctgccag catgctaacc  
420  
ctcgccccca ttgccatcga ccgctactat gctgtcctgt accccatggt gtaccccatg  
480  
aagatcacag ggaaccgggc tgtgatggca cttgtctaca tctggcttca ctcgctcata  
540  
ggctgcctgc caccctgtt tgggtggta tccgtggagt ttgacgagtt caaatggatg  
600  
tgtgtggctg cttggcaccg ggagcctggc tacacggcct tctggcagat ctggtgtgcc  
660  
ctcttccctt ttctggcat gctggtgtgc tatggcttca tcttccgcgt ggccagggtc  
720  
aaggcacgca aggtgcactg tggcacagtc gtcacgtgg aggaggatgc tcagaggacc  
780  
gggaggaaga actccagcac ctccacacctcc tcttcaggca gcaggaggaa tgcctttcag  
840  
ggtgtggctt actcggccaa ccagtgc当地 gccctcatca ccattcctggt ggtcctcggt  
900  
gccttcatgg tcacctgggg cccctacatg gttgtcatcg cctctgaggc cctctgggg  
960  
aaaagctccg tctcccgag cctggagact tggccacat ggctgtcctt tgccagcgct  
1020  
gtctgccact ccctgatcta tggactctgg aacaagacag ttgc当地aaaactactggc  
1080  
atgtgcttg gggaccggta ttatcggaa ccattgtgc aacgacagag gacttccagg  
1140  
ctcttcagca tttccaacag gatcacagac ctggccctgt ccccacacct cactgcgc当地  
1200  
atggcagggtg gacagccccct ggggcacagc agcagcacgg gggacactgg cttcagctgc  
1260  
tcccaggact cagggacaga tatgatgctg cttgaggact acacgtctga tgacaaccct  
1320  
ccctctcact gcacttgccc acccaagaga aggagctcg tgacattga ggatgaagtg  
1380  
gaaccaaatca aagaagctgc caagaactcg attcttcatg tgaaagctga agtacacaag  
1440

tccttggaca gttacgcagc aagcttggcc aaagccattg aggccgaagc caaaatcaac  
1500

ttatgggg aggaggctt gccaggggtc ttggttacag cacggactgt cccggggggc  
1560

ggcttcgggg gcccggagg cagcagaact cttgtgagcc agaggctgca gttgcagagc  
1620

atcgaagaag gagatgtttt agctgccgag cagagatga

1659

<210> 4

<211> 552

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Val Thr Lys Pro Gly Asn Ile Val Val Gln His Ala Leu Pro Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Ala Leu Thr Met Ser Leu Asn Ser Ser Leu Ser Cys

20 25 30

Arg Lys Glu Leu Ser Asn Leu Thr Glu Glu Glu Gly Gly Glu Gly

35 40 45

Val Ile Ile Thr Gln Phe Ile Ala Ile Ile Val Ile Thr Ile Phe Val

50 55 60

Cys Leu Gly Asn Leu Val Ile Val Val Thr Leu Tyr Lys Lys Ser Tyr

65 70 75 80

Leu Leu Thr Leu Ser Asn Lys Phe Val Phe Ser Leu Thr Leu Ser Asn

85 90 95

Phe Leu Leu Ser Val Leu Val Leu Pro Phe Val Val Thr Ser Ser Ile

100 105 110

Arg Arg Glu Trp Ile Phe Gly Val Val Trp Cys Asn Phe Ser Ala Leu

115 120 125

Leu Tyr Leu Leu Ile Ser Ser Ala Ser Met Leu Thr Leu Gly Val Ile

130 135 140

Ala Ile Asp Arg Tyr Tyr Ala Val Leu Tyr Pro Met Val Tyr Pro Met

145 150 155 160

Lys Ile Thr Gly Asn Arg Ala Val Met Ala Leu Val Tyr Ile Trp Leu

165 170 175

His Ser Leu Ile Gly Cys Leu Pro Pro Leu Phe Gly Trp Ser Ser Val

180 185 190

Glu Phe Asp Glu Phe Lys Trp Met Cys Val Ala Ala Trp His Arg Glu  
195 200 205  
Pro Gly Tyr Thr Ala Phe Trp Gln Ile Trp Cys Ala Leu Phe Pro Phe  
210 215 220  
Leu Val Met Leu Val Cys Tyr Gly Phe Ile Phe Arg Val Ala Arg Val  
225 230 235 240  
Lys Ala Arg Lys Val His Cys Gly Thr Val Val Ile Val Glu Glu Asp  
245 250 255  
Ala Gln Arg Thr Gly Arg Lys Asn Ser Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser  
260 265 270  
Gly Ser Arg Arg Asn Ala Phe Gln Gly Val Val Tyr Ser Ala Asn Gln  
275 280 285  
Cys Lys Ala Leu Ile Thr Ile Leu Val Val Leu Gly Ala Phe Met Val  
290 295 300  
Thr Trp Gly Pro Tyr Met Val Val Ile Ala Ser Glu Ala Leu Trp Gly  
305 310 315 320  
Lys Ser Ser Val Ser Pro Ser Leu Glu Thr Trp Ala Thr Trp Leu Ser  
325 330 335  
Phe Ala Ser Ala Val Cys His Ser Leu Ile Tyr Gly Leu Trp Asn Lys  
340 345 350  
Thr Val Arg Lys Glu Leu Leu Gly Met Cys Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr  
355 360 365  
Arg Glu Pro Phe Val Gln Arg Gln Arg Thr Ser Arg Leu Phe Ser Ile  
370 375 380  
Ser Asn Arg Ile Thr Asp Leu Gly Leu Ser Pro His Leu Thr Ala Leu  
385 390 395 400  
Met Ala Gly Gly Gln Pro Leu Gly His Ser Ser Ser Thr Gly Asp Thr  
405 410 415  
Gly Phe Ser Cys Ser Gln Asp Ser Gly Thr Asp Met Met Leu Leu Glu  
420 425 430  
Asp Tyr Thr Ser Asp Asp Asn Pro Pro Ser His Cys Thr Cys Pro Pro  
435 440 445  
Lys Arg Arg Ser Ser Val Thr Phe Glu Asp Glu Val Glu Gln Ile Lys  
450 455 460  
Glu Ala Ala Lys Asn Ser Ile Leu His Val Lys Ala Glu Val His Lys  
465 470 475 480  
Ser Leu Asp Ser Tyr Ala Ala Ser Leu Ala Lys Ala Ile Glu Ala Glu

485

490

495

Ala Lys Ile Asn Leu Phe Gly Glu Glu Ala Leu Pro Gly Val Leu Val

500

505

510

Thr Ala Arg Thr Val Pro Gly Gly Phe Gly Gly Arg Arg Gly Ser

515

520

525

Arg Thr Leu Val Ser Gln Arg Leu Gln Leu Gln Ser Ile Glu Glu Gly

530

535

540

Asp Val Leu Ala Ala Glu Gln Arg

545

550

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/00052

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 A01K67/027 C12N15/62  
C12Q1/68 A61K38/17 G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07K A01K C12N C12Q A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 05225 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;SOPPET DANIEL R (US); LI YI (US); ADAMS) 22 February 1996 (1996-02-22) the whole document	2
X	US 5 817 477 A (LI YI ET AL) 6 October 1998 (1998-10-06) the whole document	2
X	WO 98 20040 A (INCYTE PHARMA INC ;AU YOUNG JANICE (US); GOLI SURYA K (US); GUEGLE) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document	2
P, X	WO 99 32519 A (FORTIN YVES ;LEMBO PAOLA (CA); AHMAD SULTAN (CA); BANVILLE DENIS ()) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document	2
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2000

Date of mailing of the international search report

24/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/00052

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 12635 A (ICOS CORP) 9 June 1994 (1994-06-09) the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/00052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9605225	A 22-02-1996	AU 7669394 A		07-03-1996
		EP 0773959 A		21-05-1997
		JP 10510701 T		20-10-1998
		US 5994506 A		30-11-1999
US 5817477	A 06-10-1998	US 5994506 A		30-11-1999
WO 9820040	A 14-05-1998	US 5817480 A		06-10-1998
		AU 5169598 A		29-05-1998
		EP 0941249 A		15-09-1999
WO 9932519	A 01-07-1999	AU 1990499 A		12-07-1999
WO 9412635	A 09-06-1994	AT 164884 T		15-04-1998
		CA 2128208 A		09-06-1994
		DE 69317883 D		14-05-1998
		DE 69317883 T		12-11-1998
		EP 0630405 A		28-12-1994
		EP 0846762 A		10-06-1998
		ES 2118372 T		16-09-1998
		JP 7503145 T		06-04-1995
		US 5759804 A		02-06-1998